

**BÚSQUEDA DEL MEJOR MEDIO DE CULTIVO Y MODELAMIENTO CINÉTICO
PARA LA OBTENCIÓN DEL ÁCIDO LÁCTICO A PARTIR DE GLUCOSA POR
VÍA FERMENTATIVA**

MARIA PATRICIA OROZCO MURILLO

JUAN ANDRÉS SOLARTE

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE MANIZALES
FACULTAD DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA
INGENIERÍA QUÍMICA**

2003

**BÚSQUEDA DEL MEJOR MEDIO DE CULTIVO Y MODELAMIENTO CINÉTICO
PARA LA OBTENCIÓN DEL ÁCIDO LÁCTICO A PARTIR DE GLUCOSA POR
VÍA FERMENTATIVA**

MARIA PATRICIA OROZCO MURILLO

394526

Línea de Profundización en Alimentos

JUAN ANDRÉS SOLARTE

394516

Línea de Profundización en Ingeniería Ambiental

**Trabajo para optar al título de
Ingeniero Químico**

DIRECTORA

GLORIA INÉS GIRALDO

Tecnóloga Química

Especialista en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Administradora de Empresas

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SEDE MANIZALES

FACULTAD DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA

INGENIERÍA QUÍMICA

2003

DEDICATORIA

A Dios por darme la oportunidad de realizar mi sueño, a mis padres por su amor, comprensión y esfuerzo, a mi demás familia por su sacrificio y apoyo, a mi esposo por su dedicación incondicional y constante.

Maria Patricia.

CONTENIDO

RESUMEN.....	11
ABSTRACT.....	12
INTRODUCCION.....	13
1. ASPECTOS FUNDAMENTALES.....	16
1.1 ÁCIDO LÁCTICO	16
1.1.1 Propiedades del ácido láctico.....	17
1.1.2 Obtención de ácido láctico	18
1.1.3 Antecedentes	21
1.1.4 Algunos procedimientos industriales.....	24
1.1.5 Recuperación y purificación	27
1.1.6 Utilización del ácido láctico	28
1.2 MICROORGANISMO (<i>LACTOBACILLUS</i>)	31
1.3 MEDIO DE CULTIVO	35
1.3.1 Preparación del medio de cultivo	37
1.4 MODELAMIENTO CINÉTICO	39
1.4.1 Modelos cinéticos de procesos simples	40
1.4.2 Modelos de crecimiento microbial	42
1.4.3 Fases del ciclo de crecimiento en un cultivo por lotes	43
1.4.4 Modelos de crecimiento no estructurados.....	48
1.4.5 El modelo de Monod	49
1.4.6 Otros modelos constitutivos del crecimiento celular.....	51
2. DISEÑO METODOLÓGICO	55
2.1 MATERIALES Y EQUIPOS.....	55
2.1.1 Equipos de análisis.	56
2.1.2 Equipos de proceso.	57
2.2 MÉTODOS	57
2.2.1 Métodos Analíticos	57

2.2.2	Método de procedimiento general.....	59
2.3	PREPARACIÓN DE LA CEPA DE <i>LACTOBACILLUS DELBRUECKII</i> <i>NRRL B-763</i>	61
2.3.1	Activación de la cepa	64
2.3.2	Mantenimiento de la cepa y selección del medio de mantenimiento.....	64
2.3.3	Conservación de la cepa.....	65
2.4	DETERMINACIÓN DEL MEDIO ÓPTIMO DE FERMENTACIÓN.....	66
2.4.1	Etapas de adaptación	66
2.4.2	Etapas de producción	67
2.5	DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EL MEJOR MEDIO DE CULTIVO	68
2.6	BIOSÍNTESIS DE ÁCIDO LÁCTICO.....	70
2.6.1	Recuperación de ácido láctico	73
2.6.2	Determinación de las curvas biocinéticas	74
2.6.3	Modelamiento de la cinética de la fermentación	75
3.	RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	76
3.1	MÉTODOS ANALÍTICOS.....	76
3.1.1	Caracterización del jarabe de glucosa	76
3.1.2	Curva patrón de azúcares reductores	76
3.1.3	Curva patrón de ácido láctico.....	77
3.2	PREPARACIÓN DE LA CEPA.....	78
3.2.1	Selección del medio de activación de la cepa.....	78
3.2.2	Conservación de la cepa.....	78
3.3	DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EL MEJOR MEDIO DE CULTIVO	79
3.4	BIOSÍNTESIS DEL ÁCIDO LÁCTICO.....	83
3.4.1	Determinación de las curvas biocinéticas	83
3.4.2	Modelamiento de la cinética de la fermentación	84
	CONCLUSIONES.....	91
	RECOMENDACIONES.....	93
	BIBLIOGRAFÍA.....	94

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del ácido láctico.	17
Tabla 2. Producción de ácido láctico a pequeña escala por diferentes cepas homolácticas.....	22
Tabla 3. Producción de ácido láctico a partir de papa.	22
Tabla 4. Resultados de fermentación de melaza con malta.....	23
Tabla 5. Características de los microorganismos productores de ácido láctico. .	27
Tabla 6. Aplicaciones industriales del ácido láctico y algunos de sus derivados.....	30
Tabla 7. Características en subgrupos del genero <i>Lactobacillus</i>	34
Tabla 8. Requerimientos de nutrientes de los microorganismos y formas comunes de satisfacerlos en cultivos.....	37
Tabla 9. Medios de Cultivo.....	38
Tabla 10. Resumen de las relaciones frecuentemente usadas para expresar cinéticas simples en el modelo de simulación de procesos de fermentación.	41
Tabla 11. Parámetros cinéticos en experimentos batch a 42°C y pH 5,6 usando <i>L. bulgaricus</i>	51
Tabla 12. Materiales empleados en el procedimiento experimental para la obtención de ácido láctico a partir de jarabe de glucosa..	55
Tabla 13. Composición del caldo y agar MRS	56
Tabla 14. Métodos empleados para la caracterización del jarabe de glucosa.....	57
Tabla 15. Caracterización del jarabe de glucosa.	58
Tabla 16. Definición de los parámetros del proceso fermentativo.....	69
Tabla 17. Variables del plan de experiencia factorial.....	69
Tabla 18. Matriz del diseño factorial 2 ³ ,	70
Tabla 19. Parámetros físico-químicos de control, variables a determinar y de respuesta *	72
Tabla 20. Resultados de la caracterización del jarabe de glucosa comercial.	76

Tabla 21. Datos para la obtención de la curva patrón de Azúcares reductores (DNS).....	76
Tabla 22. Datos para la obtención de la curva patrón de Ácido Láctico.	77
Tabla 23. Cuantificación de los niveles máximos(+) y mínimos (–).....	79
Tabla 24. Matriz de combinación de tratamientos para el plan de diseño factorial 2^3	80
Tabla 25. Respuestas obtenidas del diseño factorial (pruebas por duplicado).	80
Tabla 26. Parámetros estadísticos para ácido láctico.....	81
Tabla 27. Parámetros estadísticos para jarabe de glucosa.	82
Tabla 28. Cuantificación de los factores del diseño experimental.....	83
Tabla 29. Datos experimentales del desarrollo de la fermentación.....	84
Tabla 30. Sistema de ecuaciones para la simulación del proceso.....	85
Tabla 31. Parámetros cinéticos del sistema de ecuaciones.....	85
Tabla B1. Datos para la obtención de la curva patrón de ácido láctico *.....	101

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diferentes vías metabólicas a partir de glucosa en bacterias ácido lácticas.....	20
Figura 2. Morfología del <i>Lactobacillus delbrueckii sub especie bulgaricus</i>	31
Figura 3. Curva típica de crecimiento celular.	44
Figura 4. Influencia de la concentración de sustrato limitante en la velocidad de crecimiento específico.	50
Figura 5. Diseño esquemático global del desarrollo de la fermentación	60
Figura 6. Diagrama de flujo para la preparación de la cepa.....	62
Figura 7. Fermentación de los medios de cultivo.	68
Figura 8. Diagrama de bloques para la producción de ácido láctico vía fermentativa	73
Figura 9. Diagrama de bloques-Producción de ácido láctico-Recuperación.	74
Figura 10. Curva patrón de azúcares reductores.....	77
Figura 11. Curva patrón de ácido láctico.....	78
Figura 12. Parámetros cinéticos de la ecuación logística.	86
Figura 13. Perfil del crecimiento de biomasa en función del tiempo.	87
Figura 14. Perfil del consumo de sustrato en función del tiempo.	88
Figura 15. Perfil de la aparición de producto en función del tiempo.....	89

LISTA DE ANEXOS

Anexo A	Método del DNS para determinación de azúcares reductores	99
Anexo B	Método de cloruro férrico para la determinación de ácido láctico	101
Anexo C	Distribución de los cultivos puros	103
Anexo D	Manejo de las muestras y toma del inóculo	105
Anexo E	Conservación y mantenimiento	107
Anexo F	Pruebas microbiológicas	108
Anexo G	Biorreactor Applikon.....	111
Anexo H	Lista de símbolos	114

RESUMEN

El proceso biotecnológico de obtención de ácido láctico por fermentación con *Lactobacillus Delbrueckii* se llevo a cabo con el desarrollo de varias etapas.

La primera etapa fue la activación y acondicionamiento de la cepa láctica.

En la segunda etapa se seleccionó el medio de cultivo especial para el mantenimiento de la bacteria y se estudiaron las condiciones necesarias para lograr su conservación durante toda la investigación y trabajos posteriores.

En la tercera etapa se estudiaron diferentes combinaciones de concentraciones de nutrientes, basados en la composición del medio de cultivo (Extracto de levadura, malta y proteína), y se estableció cual de estas combinaciones ofrecía mejores rendimientos en cuanto a producción de ácido láctico.

La cuarta etapa consistió en obtener las curvas biocinéticas del proceso de fermentación, su modelamiento y simulación. Este proceso se realizó en un biorreactor agitado de 3 litros y se basó en las condiciones de operación, y la composición del medio de cultivo obtenido en la etapa anterior.

Este trabajo tiene como propósito presentar un método que permita convertir la glucosa comercial en una materia prima que genere, por medio de un proceso fermentativo, productos de alto valor agregado como el ácido láctico.

ABSTRACT

The biotechnical process of obtaining of lactic acid for fermentation with *Lactobacillus Delbrueckii* you carries out with the development of several stages

The first stage was the activation and aconditioned of the lactic stump.

In the second stage the means of special cultivation was selected for the maintenance of the bacteria and the necessary conditions were studied to achieve its conservation during the whole investigation and later works.

In the third stage different combinations of concentrations were studied of nutritious, based on the composition of the means of cultivation (yeast Extract, malt and protein), and he/she settled down which offered better yields as for production of lactic acid of these combinations

The fourth stage consisted on obtaining the curves biocinético of the process of fermentation, its model and simulation. This process was carried out in an upset biorreactor of 3 liters and it was based on the operation conditions, and the composition of the means of cultivation obtained in the previous stage.

This work has as purpose to present a method that allows to transform the commercial glucose into a matter it prevails that it generates, by means of a process fermentation, products of high value added as the lactic acid.

INTRODUCCION

El hombre necesita de los procesos bioquímicos para la obtención de productos benéficos y necesarios para la industria.

Por ello la biotecnología se ha constituido como uno de los campos de la actividad científico – técnica de mayor desarrollo y aplicación en la actualidad. La biotecnología se refiere a la aplicación de bioagentes orgánicos en la producción de bienes y servicios. Particularmente, las bacterias son capaces de transformar diferentes materiales en productos de alto valor agregado como son los ácido orgánicos en general y el ácido láctico en particular.

Actualmente el consumo de este ácido en nuestro país esta limitado principalmente a la industria de alimentos y farmacéutica, por ello se hace necesaria la investigación de la producción del mismo a nivel nacional y con una fuente de sustrato económica y confiable como los subproductos amiláceos provenientes de los cultivos como el almidón de papa o yuca, Lo que podría generar a futuro para algunas zonas de obtención de estos almidones una posible industria que genere empleo en estas zonas de producción, y comenzar a desarrollar en Colombia un proceso bioindustrial que use materias primas de bajo costo.

los componentes mas importantes del medio de cultivo con respecto al crecimiento del *lactobacilo delbrueckii*, son la concentración de fuentes de carbono y de nitrógeno. De esta manera se ha planteado como uno de los objetivos principales del presente trabajo la formulación de un medio de cultivo que favorezca la producción de biomasa y consecuentemente de ácido láctico.

También se pretende plantear otra alternativa de proceso para la obtención de ácido láctico, que permita obtener un producto de buena calidad implementando nuevas fuentes de carbono por residuos que permitan que la obtención de ácido láctico sea viable.

El proceso biotecnológico de obtención de ácido láctico por fermentación con *Lactobacillus Delbrueckii* se llevo a cabo con el desarrollo de varias etapas.

La primera etapa fue la activación y acondicionamiento de la cepa láctica.

En la segunda etapa se seleccionó el medio de cultivo especial para el mantenimiento de la bacteria y se estudiaron las condiciones necesarias para lograr su conservación durante toda la investigación y trabajos posteriores.

En la tercera etapa se estudiaron diferentes combinaciones de concentraciones de nutrientes, basados en la composición del medio de cultivo (Extracto de levadura, malta y proteína), y se estableció cual de estas combinaciones ofrecía mejores rendimientos en cuanto a producción de ácido láctico.

La cuarta etapa consistió en obtener las curvas biocinéticas del proceso de fermentación, su modelamiento y simulación. Este proceso se realizó en un biorreactor agitado de 3 litros y se basó en las condiciones de operación, y la composición del medio de cultivo obtenido en la etapa anterior.

Este trabajo tiene como propósito presentar un método que permita convertir la glucosa comercial en una materia prima que genere, por medio de un proceso fermentativo, productos de alto valor agregado como el ácido láctico.

1. ASPECTOS FUNDAMENTALES

1.1 ÁCIDO LÁCTICO

El ácido láctico es uno de los ácidos más antiguos que se conoce, es el principal componente de la leche agria de donde deriva su nombre y se obtiene por la fermentación del azúcar de la leche (lactosa) por el *Streptococcus lactis* [3].

Fue descubierto en 1780 por un químico sueco llamado Scheele quien lo aisló de la leche agria. Posteriormente se apreció este mismo en la sangre humana. En 1839 se produjo por primera vez ácido láctico por fermentación de carbohidratos como sacarosa, lactosa, manitol, almidón etc. Sin embargo, el procedimiento industrial sólo se estableció en 1881 [37].

El ácido láctico, cuyo nombre químico es ácido 2-hidroxipropanóico o ácido α -hidroxipropiónico, se representa por la estructura molecular $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$. Se han reportado tres isómeros de este ácido, que son [13]:

- El ácido L(+) Láctico: Se encuentra en los músculos, donde se forma por descomposición del glucógeno debido a esfuerzos continuos, causando fatiga muscular. Se puede obtener del extracto de la carne, se conoce como ácido sarcoláctico (del griego *sarkos*: (carne)).
- El ácido D(-) Láctico: Se obtiene por fermentación de azúcares como la sacarosa a través de bacilos como el *Acidi laevolactiti*.
- El ácido d, L-Láctico: Se obtiene por fermentación de lactosa mediante la acción de microorganismos como el *Lactobacilos bulgaricus*.

1.1.1 Propiedades del ácido láctico. El ácido láctico es un líquido viscoso, sin olor, sin color y no volátil. Es soluble en todas las proporciones en el agua, en el alcohol y en el éter; insoluble en benzol y en cloroformo. Tiene una densidad relativa entre 1,21 - 1,23 a temperatura de 25 °C. El ácido láctico comercial puede tener purezas de 40 %, 75 % y 80 %.

El ácido láctico que se obtiene por fermentación es de color amarillento y tiene impurezas como ácidos orgánicos (acético, butírico, tartárico, cítrico), sales minerales, azúcares, glicerina, etc.

En la Tabla 1 se presentan otras propiedades fisicoquímicas del ácido láctico.

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del ácido láctico.

Formula empírica	$C_3H_6O_3$
Peso molecular	90,08 g/mol
Gravedad específica	1,249 15 °C / 4 °C
Punto de fusión	D(+) y L(-): 52,8 a 54 ° C D y L (según su composición): 16,8 a 33 °C
Índice de refracción	1,4414
Calor de combustión	3616 cal/g
Viscosidad	28,5 cp
Densidad	1,1748 g/mL

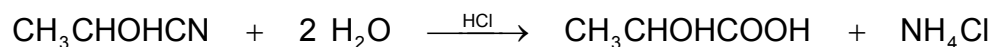
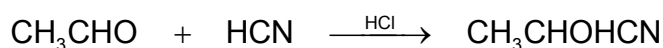
Fuente: PERRY, R. *et al.* Manual del Ingeniero Químico. Sexta edición en español. Volumen 6, McGraw Hill, México, 1992.

Las cantidades máximas en ppm de cloruros, sulfatos, calcio y hierro presentes en el ácido láctico comercial son 10, 30, 20 y 10 respectivamente. Lo máximo en ácidos volátiles como ácido acético es 0,5 % [15].

1.1.2 Obtención de ácido láctico. El ácido láctico es obtenido a escala industrial por medio de métodos fermentativos o sintéticos. El producto logrado vía fermentativa es ópticamente activo y el sintético es inactivo [37].

En los últimos años, la producción por fermentación ha sido exitosa debido al incremento en la demanda de ácido láctico obtenido naturalmente.

➤ **Vía sintética:** Desde 1960 el ácido láctico es producido por vía sintética. Se han considerado varios métodos para la producción industrial, el método más utilizado se basa en la reacción del acetaldehído con el cianuro de hidrógeno, seguida de la hidrólisis del lactonitrilo resultante.



- Otro tipo de mecanismo, se basa en la reacción a alta presión de acetaldehído con monóxido de carbono y agua en presencia de ácido sulfúrico como catalizador.
- Igualmente, puede producirse por cloración y subsiguiente hidrólisis del ácido propiónico.

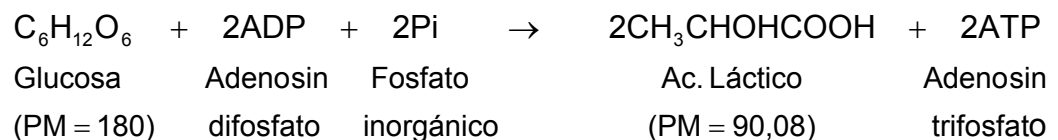
➤ **Vía fermentativa:** Para la fabricación industrial de ácido láctico, se emplean productos que contienen gran cantidad de hidratos de carbono como maíz, fécula de papa, melazas y el suero de leche. El almidón ha de someterse previamente a tratamiento ácido o enzimático para hidrolizarlo a glucosa.

La elección del material a fermentar depende de la facilidad de su adquisición, del tratamiento que se requiere previo a la fermentación y del microorganismo que se debe utilizar según el sustrato [15].

Entre las bacterias lácticas, adecuadas para fermentar un sustrato se deben escoger las que acidifican mejor, que preferiblemente no favorezcan la aparición de productos secundarios, que no tengan exigencias para su nutrición y que se puedan seguir cultivando puros fácilmente. Según Ullman [37], Kownatzki demostró que en una producción en gran escala el aire es perjudicial.

El metabolismo de las bacterias lácticas puede dividirse en dos tipos: fermentaciones homolácticas y heterolácticas.

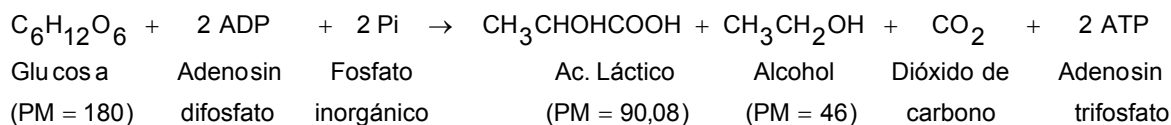
- En las fermentaciones homolácticas, partiendo de carbohidratos es convirtiendo casi por entero el azúcar en ácido láctico. Solo cuando las fermentaciones se realizan en un medio alcalino pueden acumularse en cantidades considerables otros productos, como formiato, acetato y etanol.



Las bacterias que tienen este tipo de metabolismo son *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus leichmanii*, *Lactobacillus casei* y *salivarius* además incluyen los géneros *Pediococcus* y *Streptococcus*. [14].

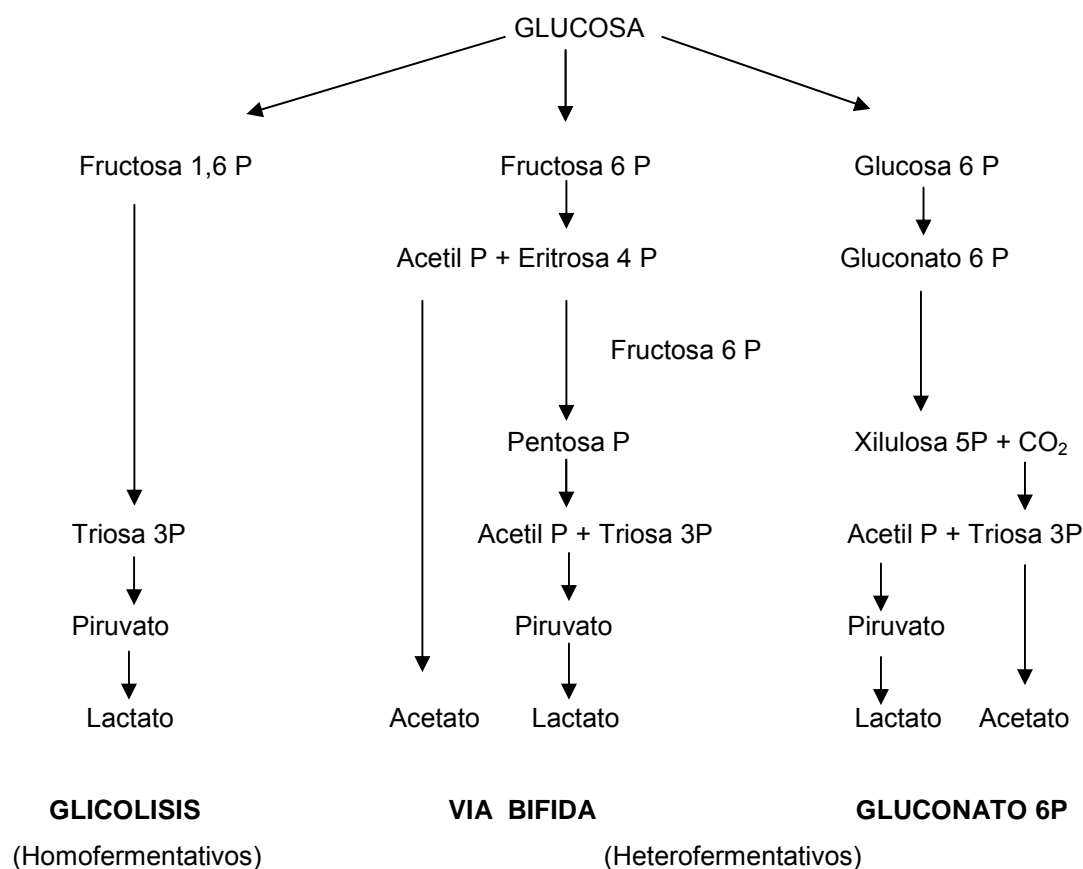
- Las fermentaciones heterolácticas producen un menor rendimiento de ácido láctico y convierten una parte del azúcar en grandes cantidades de otros

productos como ácido acético, etanol, glicerol y dióxido de carbono dependiendo de las materias primas utilizadas.



Las bacterias que tienen este tipo de metabolismo son: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus bifidus*, además incluye las bacterias del genero *Leuconostoc* [14].

Figura 1. Diferentes vías metabólicas a partir de glucosa en bacterias ácido lácticas.



Fuente: SURIDERP, Chahal. ULLMAN'S Encyclopedia of industrial chemistry: ácido láctico. 5 edition. De Barbara Elvers editors. A15, (1995); p 97-104.

Aunque cada tipo de fermentación ocurre dependiendo el tipo de bacterias existentes, una fermentación homoláctica se puede convertir en heteroláctica cambiando las condiciones de cultivo.

1.1.3 Antecedentes. El ácido láctico obtenido por fermentación, despierta el interés de los investigadores a múltiples estudios sobre el proceso metabólico de su obtención por algunas especies lácticas.

Según Ullmann [37], antiguamente se obtenía el ácido láctico agregando a las soluciones azucaradas, queso en estado de descomposición y óxido de zinc o carbonato de zinc, a una temperatura entre 35-50 °C. También se producía, cuando al suero extraído por filtración de la leche agria se le adicionaba óxido de zinc y se dejaba fermentar entre 25-35 °C; de esta manera se formaba un lactato de zinc, que se descomponía después de su cristalización por adición de ácido sulfúrico. Estos procesos tienen un rendimiento bajo y frecuentemente se obtiene mas ácido butírico y acético que láctico. Esto obligó a buscar nuevos procedimientos, para una mayor producción de ácido láctico a escala industrial y a investigar las especies y sus condiciones de vida antes de utilizarlas para la producción de dicho ácido.

Según Pederson¹, la producción comercial de ácido láctico se inicio en 1881. En 1893 Lafar y en 1896 Leichmann, se dedicaron a cultivar en estado de pureza los hongos del ácido láctico. Wehmer en 1895, fue el primero que aplicó en gran escala cultivos puros; Kowntzki en 1902 cultivo las bacterias del ácido láctico en equipos con una capacidad de 1000 – 2000 litros.

Tatum y Peterson (1935), describieron la producción de ácido láctico L(+) a pequeña escala utilizando glucosa como sustrato. Ellos reportan resultados de

¹ PEDERSON, Carl S. Microbiology of food fermentations, 2ed, Westport. Edit. Conn Avi, 1979. p 384. Citado por GUZMÁN, M. Rosmery y HERNANDEZ, A. Martha Lucia. Fermentación anaerobia del suero láctico desproteínizado. Medellín, 1990. Trabajo de grado. Universidad Nacional de Colombia.

rendimiento con base a azúcar total, lo que corresponde al rendimiento real de la fermentación (Rr), a partir de tres cepas diferentes cuyo metabolismo es homoláctico (Tabla 2) [38].

Tabla 2. Producción de ácido láctico a pequeña escala por diferentes cepas homolácticas.

Microorganismo	g de ácido láctico/540 g de azúcar [g]	Glucosa convertida en ácido láctico [%]
<i>Streptococcus lactis</i>	510	94
<i>Lactobacillus casei</i>	505	93
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	517	95

Fuente: TATUM, E. L.; PETERSON, W.H. Fermentation method for production of dextrolactic acid. Ind. Eng. Chem. 27, (1935); p. 1493.

Un método industrial para la obtención de ácido láctico a partir de papa fue descrito por Cordón *et al.* En este caso se utilizaron amilasas fúngicas de *Aspergillus niger* para degradar el almidón. Tres bacterias diferentes fueron utilizadas para este tipo de proceso (Tabla 3) [9].

Tabla 3. Producción de ácido láctico a partir de papa.

Microorganismo	Rendimiento de ácido láctico		
	Basado en material Orgánico	Basado en azúcares totales	Basado en azúcar consumido
<i>Lactobacillus</i> **	52,9	61,9	76,0
<i>Lactobacillus pentosus</i> (124-2)	77,1	91,2	95,2
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> (NRLB-445)	64,5	79,4	93,8

** cepa obtenida por cultivo aeróbico a nivel de laboratorio.

Fuente: CORDON, T.C. et al. Lactic acid from potatoes. Ind. Eng. Chem. 42, 1950, p. 1833 –1836.

La producción de ácido láctico, así como también algunas de sus sales a partir de suero libre de albúmina, con la adición de nutrientes fue reportada en 1953 por Cambell [8]. El microorganismo utilizado fue *Lactobacillus bulgaricus* (ATCC9224), reportando rendimientos que variaron entre 85-90 % basados en el peso de lactosa.

En 1940 fue reportado un método para acelerar la fermentación ácido láctica de glucosa o melazas de caña, utilizando malta sin calentar como un nutriente para *Lactobacillus delbrueckii* [28]. El incremento en la velocidad de fermentación se debió a un factor de crecimiento sensible a la temperatura presente en la malta (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados de fermentación de melaza con malta.

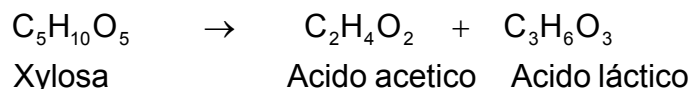
Ítems	Unidades	Ensayo
Melaza	Libra	120,2
Azúcar	% P/V	55,9
Malta	Libra	14,7
CaCO ₃	Libra	33,0
Tiempo	H	20
Azúcar inicial	% P/V	12,6
Azúcar final	% P/V	1,10
Ácido láctico	% P/V	11,0
Rendimiento azúcar fermentado	%	95,7
Rendimiento azúcar en melaza	%	87,3

Fuente: STENROOS, S.L; LINKO, Y; y linko, p. Production of L – lactic acid with inmobilized *Lactobacillus delbrueckii*. Biotechnol Lett. 4, (1982); p. 159.

Desde hace algunos años se ha planteado el uso de células inmovilizadas para obtener rendimientos mayores en la producción de ácido láctico. En 1982, se obtuvo un rendimiento de 97% basado en glucosa, siendo más del 90% el isómero L(+) [36].

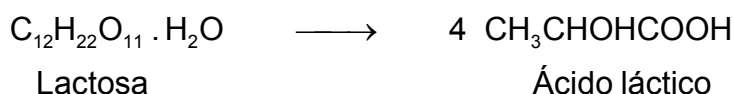
1.1.4 Algunos procedimientos industriales. A nivel industrial, la producción del ácido láctico por fermentación puede realizarse por diferentes procesos, según el sustrato así:

- A partir de Xylosa de maíz, según la reacción:



La xylosa es fermentada por el microorganismo *Lactobacillus pentoaceticus* [15]. Cerca del 85 ó 90 % de la xylosa puede ser transformada en ambos ácidos. Adicionalmente LUO, Jun, *et al.* Utilizaron el residuo de la mazorca del maíz obtenido de la manufactura de xylosa y lo emplearon como sustrato en el proceso simultáneo de sacarificación y fermentación del ácido láctico [21]. La composición del residuo de maíz fue la siguiente: celulosa 62 %, hemicelulosa 19 %, lignina 13 %. El microorganismo utilizado fue el *Lactobacillus delbrium*. Además reportaron una relación de conversión de ácido láctico del 79 % basada en el consumo de celulosa.

- Partiendo de la papa, con microorganismos del tipo *Lactobacillus pentosus* o *Lactobacillus delbrueckii*, a temperatura de 45 °C y pH entre 5 – 6.
- De la lactosa del suero, se puede obtener ácido láctico por la siguiente reacción:



Para esta fermentación se puede utilizar el *Lactobacillus bulgaricus* o el *Streptococcus lactis*. Según el microorganismo utilizado diferirán las condiciones requeridas en el proceso.

El *Streptococcus láctis* puede trabajar en un intervalo de temperatura de 30-35 °C y de pH de 5-6; estas condiciones favorecen el crecimiento de otras especies y por lo tanto se pueden formar otros productos contaminantes, presentándose así una producción baja. El *Lactobacillus bulgaricus* trabaja en un intervalo de temperatura de 41 – 45 °C y de pH de 5-6; estas condiciones no favorecen el crecimiento de otras especies contaminantes, es homofermentativo y produce mayor cantidad de ácido [15].

La producción industrial de ácido láctico requiere de inóculos muy grandes los cuales tienen que ser cultivados en el laboratorio de acuerdo al microorganismo a utilizar. Para el *Lactobacillus delbrueckii*, se requieren las siguientes condiciones de proceso: pH 5,0 – 5,8, un agente neutralizante como el carbonato de calcio o la soda (CaCO_3 , NaOH) (si el nivel de ácido láctico libre alcanza 1-2 % del peso total, las bacterias pueden morir), temperatura 43°C, tiempo de fermentación 42 h. Según LIMA, *et al.* [20] realizando esta operación en tanques contruidos en madera o acero inoxidable con una capacidad de 23 mil litros, se obtuvieron rendimientos del 85 al 90 % en relación al azúcar consumido.

La temperatura óptima para la cual el *Lactobacilo* exhibe una actividad máxima es de alrededor de 50 °C y se recomienda un pH entre 5 y 5,5, este tipo de fermentación elimina los problemas de contaminación y permite trabajar el medio con solo haber realizado una pasteurización, sin necesidad de autoclave o someter el proceso completo a presión, este procedimiento convierte el ácido láctico en lactato de calcio. El hidróxido de magnesio, cal y otros nutrientes e ingredientes que pueden haber sido adicionados en el agua, son removidos por filtración.

En un proceso industrial, el Lactobacilo es trasladado progresivamente desde el tubo de ensayo a frascos, y por último, a los fermentadores, donde se mantiene un nivel de inóculo del 10%.

Cada traslado se hace después de 16 – 20 horas de crecimiento a 43 °C, con control constante. El medio, consiste en 15% de glucosa, 0,4% de malta germinada, 0,25% de fosfato diamónico y 10% de carbonato de calcio, no se esteriliza. La industria se basa en la limpieza, la alta temperatura y el bajo pH para restringir las contaminaciones, en especial por bacterias butíricas.

Esta fermentación requiere 4 a 6 días, cuando la concentración de azúcar se reduce al 0,1% o menos y el rendimiento alcanza el 90 al 95%. Como la fermentación es anaeróbica, debe suprimirse cualquier entrada de aire. Es necesario mantener el medio en continua agitación para evitar la precipitación del agente neutralizante [13].

El efecto del pH en la fermentación, para el caso de la β -galactosidasa fue estudiado por BURGOS, *et al.* [7]. Sin control de pH la velocidad de reacción es mucho menor y sólo cerca del 20 % del sustrato (lactosa) es consumido. A medida que la concentración inicial de sustrato incrementa, la densidad celular, la concentración de ácido láctico y la productividad incrementan. Cuando el ácido láctico se produce, el pH del medio disminuye, con lo que decrece el crecimiento del microorganismo y reduce la productividad. El pH necesita ser controlado para optimizar la fermentación.

En experimentos con control manual de pH a $5 \pm 0,2$ con baja concentración inicial de sustrato, fue observada una correlación lineal entre la velocidad de crecimiento específico y la velocidad de producción de ácido láctico. Por otro lado, en experimentos con pH controlado en el mismo rango de pH pero con alta concentración inicial de sustrato, dos fases en el crecimiento del microorganismo fueron observadas. En la primera fase, el crecimiento del microorganismo está directamente asociado con la producción de ácido láctico. En la segunda fase, el crecimiento del microorganismo es aproximadamente constante.

En consecuencia, la producción de ácido láctico fue incrementando como resultado de un decrecimiento en el consumo de sustrato para el mantenimiento del microorganismo. Para la producción de ácido láctico, los experimentos a pH controlados indicaron altas velocidades de reacción [7].

En la Tabla 5 se presentan algunos microorganismos empleados en la producción de ácido láctico.

Tabla 5. Características de los microorganismos productores de ácido láctico.

Microorganismos	Morfología	Substratos	Temperatura óptima	Ácido producido
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Bacilo	Lactosa, suero	45 – 50 °C	Racémico
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Bacilo	Glucosa, melazas	45 – 50 °C	L (+)
<i>Lactobacillus brevis</i>	Bacilo	Pentosas, madera hidrolizada	30 °C	Racémico
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilo	Pentosas, lejías sulfíticas	30 °C	Racémico
<i>Streptococcus lactis</i>	Coco	Lactosa, suero	35 °C	L (+)
<i>Rhizopus oryzae</i>	Moho	Glucosa, almidón	30 °C	L (+)

Fuente: Enciclopedia Salvat. Ciencia y tecnología. Tomo I. p. 101-103

1.1.5 Recuperación y purificación. La recuperación del ácido láctico de los caldos de fermentación es dificultosa, debido a la baja tensión del vapor del ácido láctico y su tendencia a formar anhídridos y a experimentar autoesterificación cuando se le calienta y concentra por encima del 20 % y también a que su solubilidad es similar a la del agua [13]. Los contaminantes importantes son proteínas, azúcares no fermentados, sales inorgánicas y materias coloreadas. La práctica corriente es coagular las proteínas y neutralizar completamente el ácido láctico calentando a 90 °C con exceso de cal.

El caldo fermentado es calentado a 70°C para matar las bacterias y posteriormente acidificado hasta un pH de 1,8 utilizando ácido sulfúrico el cual regenera el ácido láctico y precipita el calcio como sulfato de calcio. No obstante, en la mayoría de procesos, el ácido láctico es recuperado bajo la forma de sal de calcio: lactato de calcio.

Las sales y biomasa precipitadas son removidas por filtración. El filtrado resultante consiste en una solución de alrededor del 10 % en ácido láctico el cual es concentrado en un rango del 50 % al 80 % y se purifica por extracción, intercambio iónico o esterificación. Se mejora el olor y el sabor con peróxido de hidrógeno y/o celdas de carbón dependiendo de los requerimientos [20].

El proceso de refinación incluye un tratamiento con carbón activado que remueve impurezas orgánicas, seguido de un tratamiento con ferrocianuro que depone los metales pesados y una filtración que remueve impurezas que se han coagulado durante la fermentación. La solución es filtrada y pasada dentro de una resina intercambiadora que remueve las trazas de contaminación.

1.1.6 Utilización del ácido láctico. El ácido láctico tiene aplicación en el tratamiento y teñido de pieles, en la tintorería de telas de algodón y seda.

En la industria de alimentos es comúnmente usado en esencias, extractos, jarabes, zumos de fruta, refrescos y otros; además sustituye los ácidos cítricos y tartárico dando mayor estabilidad y mejor sabor a los productos. En destilería y fábricas de levaduras se emplea como antiséptico contra los hongos perjudiciales. También es materia prima en la producción de plásticos acrílicos, que se utilizan en los recubrimientos metálicos resistentes. En forma de lactato se usa para productos farmacéuticos sustituyendo la glicerina [20].

A partir del ácido láctico por un proceso de condensación se obtienen algunos polímeros, entre los que se encuentra el ácido poliláctico; de este último, puede obtenerse algunas resinas que reaccionan con diferentes aceites, como ricino, lino, soya, etc. El tratamiento se hace a temperaturas entre 255-280 °C y con catalizadores como óxidos de aluminio, cobalto, hierro. Estas resinas, disueltas en tolueno, acetona y otros derivados del petróleo permiten obtener barnices, también es utilizado como plastificante de materiales a base de cloruro de vinilo, como acrilatos y metacrilatos que pueden dar lugar a diversas resinas. Los ésteres acrílicos y lactamidas se emplean como insecticidas. Las resinas fenólicas, acrílicas, etc, preparada del ácido láctico pueden usarse en la preparación de polímeros que reemplazan el vidrio; También se destinan a la elaboración de agentes impregnadores de materias textiles y como adherentes [15].

Los derivados del ácido láctico como ésteres y éteres se emplean como disolventes en la preparación de lacas, barnices y tintas, destacándose entre ellos lactatos como etílico, metílico y butílico.

Regionalmente lo utilizan empresas como Lucta gran Colombiana Ltda.; Special fabrica de productos de caucho Eterna S.A.; Industrias Zolaeché Ltda.; Instituto Farmacológico Colombiano Ltda.; Quibi S.A.; John Simon y Cia Ltda.; Moderpan de Colombia S.A.; Griffith de Colombia S.A.; Preparaciones de belleza S.A. Prebel; Yardley of London Colombiana S.A.; Merck Colombia S.A.; Industrias Philips de Colombia S.A.

Estas empresas lo importan de países como Brasil, España, Alemania, Holanda, Nigeria, USA, Reino Unido, Canadá; en diferentes cantidades [15].

La Tabla 6, resume otras aplicaciones industriales del ácido láctico y de algunos de sus derivados [37].

Tabla 6. Aplicaciones industriales del ácido láctico y algunos de sus derivados.

APLICACIONES	COMPUESTO
INDUSTRIA ALIMENTICIA	
Productos de res y pollo	Lactato de sodio potasio y amonio
Nutrición	Lactato de calcio
Ensaladas y aderezos	Ácido láctico
Confitería y dulcería	Ácido láctico
Productos libres de azúcar	Lactitol
Bebidas-Lácteos y alimentos horneados	Lactato de calcio, Gránulo polvo
INDUSTRIA QUÍMICA	
Aeroespacial	Lactato de metilo y etilo
Cuero	Ácido láctico, lactato de sodio, potasio
Detergentes	Lactato de metilo, etilo y butilo, Ac. láctico
Metálica	Lactato y ésteres de metilo, etilo, butilo
Pintura y tinta	Ácido láctico, lactato y ésteres
Polímeros biodegradables	Ácido poliláctico
Solventes de limpieza	Esteres de etilo y butilo
INDUSTRIA COSMÉTICA	
Cuidado de la piel y el cabello	Ácido láctico, lactato de sodio y de potasio
Artículos de tocador y desodorantes	Lactato de sodio y potasio
Cuidado oral	Lactato de calcio, lactato de aluminio
INDUSTRIA FARMACÉUTICA	
Soluciones normales de diálisis	Lactato de sodio y de potasio
Preparaciones minerales	Lactato de calcio y aluminio
Implantes	Ac. Láctico, glicólidos, láctidos, copolímeros, polilactidos.
Tabletas	Lactato de calcio

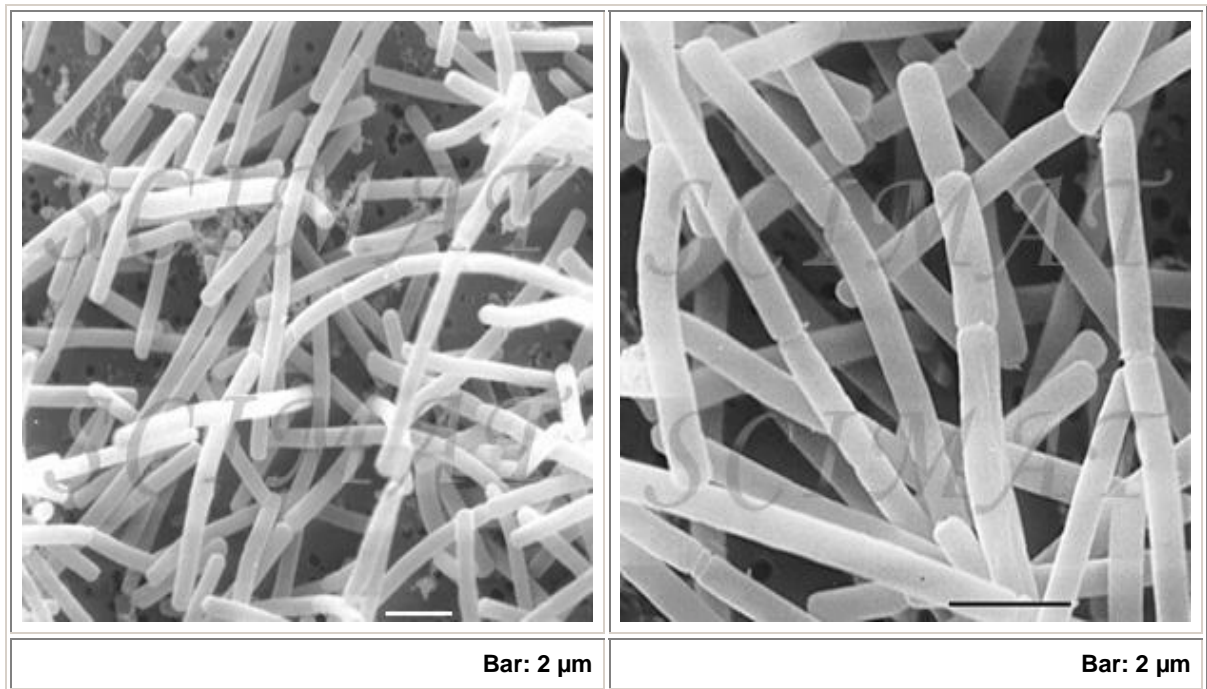
Fuente: SURIDERP, Chahal. ULLMAN'S Encyclopedia of industrial chemistry: ácido láctico. 5 edition. De Barbara Elvers editors. A15, (1995); p 97-104.

1.2 MICROORGANISMO (*LACTOBACILLUS*)

Las bacterias lácticas como el *Lactobacillus delbrueckii* son bacilos de longitud variable y de un grosor de 0,5 – 0,8 μm . Se trata de un grupo de bacterias fisiológicamente uniforme, de pared Gram-positiva, que sólo utilizan sustratos, predominantemente azúcares, de manera fermentativa con formación de ácido láctico. Carecen de actividad respiratoria porque les falta una enzima, la citocromocatalasa, que les permita poner en marcha una cadena “respiratoria” con el oxígeno como aceptor de electrones. A pesar de su metabolismo anaerobio, son aerotolerantes y en los medios de cultivos sólidos forman colonias en presencia de aire.

La principal característica del *Lactobacillus* es ser generalmente de forma redonda, variando desde el largo y tenue hacia corto y redondo [3]. En la Figura 2 se esquematiza la morfología del *Lactobacillus delbrueckii* sub especie *bulgaricus*

Figura 2. Morfología del *Lactobacillus delbrueckii* sub especie *bulgaricus*.



Fuente: Tomado de <distans.livstek.lth.se:2080/L_bulg.htm>

Las colonias formadas por los *Lactobacillus* se caracterizan por presentar un crecimiento uniforme en medios muy ricos, estas colonias de bacterias lácticas siempre permanecen relativamente pequeñas. El tamaño reducido de las colonias es atribuido principalmente al bajo rendimiento del crecimiento, como consecuencia de su metabolismo exclusivamente fermentativo. Raramente son pigmentadas, como resultado de la ausencia de citocromos.

Los *Lactobacillus* requieren no sólo carbohidratos como energía y fuente de carbono sino también nucleótidos, aminoácidos y vitaminas. Ninguna bacteria láctica crece en un medio constituido exclusivamente por sales minerales y amónicas como única fuente de nitrógeno. La mayoría necesita distintas vitaminas del grupo B (lactoflavina, tiamina, biotina, ácido nicotínico, ácido pantoténico, ácido fólico) y varios aminoácidos. Como su crecimiento disminuye linealmente en condiciones estándar en función de la concentración del nutriente, se cultivan para realizar ensayos microbianos específicos y sensibles a la presencia de pequeñas cantidades de vitaminas o aminoácidos en los alimentos [17].

En el caso del *Lactobacillus delbrueckii* se necesitan 14 aminoácidos y 4 vitaminas y es estimulado por otras sustancias. Estos factores de crecimiento pueden ser proporcionados adicionando pequeñas cantidades de malta germinada, macerados de maíz, torta de soya, leche desnaturalizada o extracto de levadura [13]. Estos requerimientos nutricionales cualitativos y cuantitativos requieren ser determinados para optimizar el crecimiento y la formación del producto.

El *Lactobacillus* ha sido ofrecido durante mucho tiempo en productos de dieta y en la mayoría de casos entraña el uso en la preparación de productos fermentados.

En primer término el *Lactobacillus delbrueckii* ha sido utilizado en la preparación

de yogur, el *Lactobacillus acidofilus* en la preparación de leche acidificada y otras especies están involucradas en la preparación de chucrut (leche fermentada con azúcar) y encurtidos. Estos microorganismos han sido usualmente más resistentes a las condiciones ácidas que otras bacterias lácticas.

Para hacer crecer las células se requiere valores de pH de alrededor de 4 y 5. A causa de esto, se puede llevar a cabo en aislamiento selectivo partiendo de materiales naturales para usar en medios que contienen carbohidratos y un pH ácido, algunas de estas fuentes pueden ser el jugo de tomate y el agar pectona.

La resistencia ácida del *Lactobacillus* permite entonces el crecimiento continuo durante las fermentaciones naturales lácticas; cuando el valor de pH ha caído hacia un valor bajo en comparación con otras bacterias lácticas el crecimiento del *Lactobacillus* es todavía apreciable para el final de las etapas de muchas de las fermentaciones ácido-lácticas [2].

El *Lactobacillus* es raramente o casi nunca patógeno, los dos *Lactobacillus* generalmente más estudiados son los *Lactobacillus* de las especies aerobios o facultativos aerobios y el *clostridium* [6].

Los más importantes productores de ácido láctico son los géneros: *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus* y *Leuconoctoc*, todos pertenecientes a la familia *Lactobacillaceae*.

Muchas especies son homofermentativas pero algunas son heterofermentativas. Dentro de la vía homofermentativa el *Lactobacillus delbrueckii*, es uno de los que reporta mejores rendimientos en ácido láctico, además con unas necesidades muy pequeñas de pasteurización, debido a los bajos valores de pH en que se produce esta fermentación, asociados con los pocos problemas de contaminación permiten un control desde el punto de vista microbiológico adecuado, para que el proceso

se pueda llevar bajo condiciones de laboratorio y pueda ser después extrapolado a un proceso industrial [17].

Según su tipo de fermentación los *Lactobacillus* han sido divididos en tres subgrupos mayores (Tabla 7):

Tabla 7. Características en subgrupos del genero *Lactobacillus*.

Características	Especie	DNA [mol %GC]
Homofermentativa		
Mayor producción de ácido láctico (>85% partiendo de glucosa) No hay formación de gas partiendo de la glucosa; hay presencia de aldolasa.		
(1) Temperatura optima 45 °C y no debe ser menor a 15 °C, Largas cadenas; Glicerol y ácido teicóico.	<i>L. cidophilus</i> <i>L. delbrueckii</i>	34 – 37 49 – 51
(2) Temperatura óptima 15 °C variable a 45 °C, cortas cadenas de microorganismos y corineformes, hay presencia de ribitol, glicerol y ácido teicoico; y se puede producir mucha fermentación oxidativa como producto del oxígeno presente.	<i>L. casei</i> , y <i>L. plantarum</i> <i>L. curvatus</i>	45 – 46 42 – 44
Heterofermentativa		
(3) Produce alrededor del 50% de ácido láctico partiendo de glucosa; produce etanol y CO ₂ ; ausencia de aldolasa; fosfoketolasa presente. Largas y pequeñas cadenas; glicerol y ácido téicóico.	<i>L. fermentum</i> <i>L. brevis</i> , y <i>L. buchneri</i> <i>L. kefir</i>	52 – 54 44 – 47 41 – 42

Fuente: BROCK Thomas; MICHAEL T; JOHN M and JACK P., Biology of Microorganisms, 7th edition. Prentice Hall. p 367-368,794-799.

1.3 MEDIO DE CULTIVO

Un medio de cultivo es un conjunto de nutrientes, factores de crecimiento y otros componentes que generan las condiciones necesarias para el desarrollo de los microorganismos [27].

Los microorganismos necesitan carbono, nitrógeno, minerales, a veces factores de crecimiento, agua y sí son aerobios oxígeno, para formar su biomasa y como fuente de energía para el mantenimiento celular y la biosíntesis del producto de su metabolismo.

La composición elemental de la mayoría de los microorganismos es muy similar y en consecuencia puede utilizarse como punto de partida para diseñar un medio de fermentación óptimo. Los valores típicos de los componentes necesarios son:

C = 45 % en peso
H = 7 % en peso
O = 33 % en peso
N = 10 % en peso
S = 2,5 % en peso

Algunos microorganismos crecen en un medio que no necesitan factores de crecimiento, mientras que otros necesitan medios complejos que contengan nutrientes específicos como aminoácidos, vitaminas o nucleótidos; sin embargo los organismos que no necesitan estos suplementos tienen frecuentemente velocidades de crecimiento más elevadas en medios complejos. Prácticamente en todas las fermentaciones industriales el carbono suministra la energía para el crecimiento y para la biosíntesis. La cantidad de carbono necesaria en condiciones aeróbicas, puede determinarse a partir del coeficiente de rendimiento de biomasa.

➤ **Carbohidratos.** Los carbohidratos son polihidroxialdehidos, polihidroxicetonas o sustancias que pueden producir este tipo de compuestos al hidrolizarse.

En una fermentación los carbohidratos más utilizados son los azúcares simples, como sacarosa o glucosa, ya que la utilización de almidón, celulosa o lignocelulosa implica la hidrólisis para desdoblarlo en azúcares reductores.

La sacarosa: se utiliza en forma cristalina o en forma bruta como zumos o melazas, subproducto de la manufactura de azúcares [27].

La celulosa: presente en la madera, es usualmente combinada con la hemicelulosa y la lignina en forma de lignocelulosa. La lignina hace a la celulosa resistente al ataque microbiano y hasta ahora los métodos químicos y enzimáticos que convierten la lingnocelulosa en azúcares fermentables no son económicos.

La glucosa: se obtiene usualmente en los medios de fermentación, a partir de la conversión enzimática directa del almidón.

➤ **Nitrógeno.** Las fuentes más importantes de nitrógeno para la fermentación son el amoniaco, los nitratos, la urea y el nitrógeno presente en los cereales, raíces y subproductos de estos.

➤ **Azufre.** El azufre puede ser suministrado mediante pequeñas cantidades de nutrientes como Na_2SO_4 , MgSO_4 y H_2S . Se debe considerar que al agregar sulfato de magnesio se está adicionando no sólo el azufre necesario sino también el magnesio que es un nutriente útil en la producción de ácido láctico.

En general los requerimientos de nutrientes que deben estar en la composición de un medio de cultivo para brindar el equilibrio entre crecimiento y biosíntesis puede ser suplido por diferentes compuestos según su elemento esencial [6].

Algunos requerimientos nutricionales de los microorganismos son mostradas en la Tabla 8.

Tabla 8. Requerimientos de nutrientes de los microorganismos y formas comunes de satisfacerlos en cultivos.

Nutriente	Forma química suministrada al medio de cultivo
Carbono	Orgánico: Medios definidos = glucosa, acetato, piruvato, malato, cientos de otros compuestos. Medios complejos = extracto de levadura, extracto de carne de res, peptona; muchos otros extractos. Inorgánico: CO_2 , HCO_3^- .
Nitrógeno	Orgánico: Aminoácidos, bases nitrogenadas Inorgánico: NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KNO_3 , N_2
Fósforo	KH_2PO_4 , Na_2HPO_4
Azufre	Na_2SO_4 , H_2S
Potasio	KCl , K_2HPO_4
Magnesio	MgCl_2 , MgSO_4
Sodio	NaCl
Hierro	FeCl_3 , $\text{Fe}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4)_2$, quelatos de hierro
Micronutrientes	COCl_2 , ZnCl_2 , CuCl_2 , MnSO_4 , Na_2SeO_4

Fuente: BROCK Thomas; MICHAEL T; JOHN M and JACK P., Biology of Microorganisms, 7th edition. Prentice Hall. p 367-368,794-799.

1.3.1 Preparación del medio de cultivo. En la actualidad la mayoría de los medios de cultivo se encuentran comercializados normalmente bajo la forma de liofilizados que es preciso rehidratar. En general, la preparación de un medio de cultivo se reduce simplemente a pesar la cantidad deseada del mismo y redisolverla en agua destilada (libre de inhibidores de crecimiento) siguiendo las instrucciones del fabricante y esterilizando en autoclave.

Antes de su esterilización, los medios líquidos en caldo se distribuyen en los recipientes adecuados (tubos o matraces); en ningún caso la altura del líquido en el recipiente debe exceder un tercio del volumen total de éste.

El uso de diversos medios semisólidos comerciales que difieren en las fuentes de carbono y nitrógeno, aporta la identificación de los componentes propios del medio que suplen las necesidades químicas de los microorganismos para llevar a cabo su crecimiento y desarrollo normal.

La Tabla 9 presenta la composición de algunos medios de cultivo y las condiciones necesarias para su manejo.

Tabla 9. Medios de Cultivo.

Medio de cultivo	Composición	Condiciones
CALDO NUTRITIVO	Peptona 15 g Extracto de levadura 3 g Cloruro sódico 6 g D(+) glucosa 1 g	pH : $4,5 \pm 0,2$ Temp. Optima 30 °C.
EXTRACTO DE MALTA	Maltosa técnica 12,75 g, dextrina 2,75 g, glicerina 2,35 g, peptona 0,78 g, agar 15 g.	pH : $4,8 \pm 0,2$ Temp. Optima 30 °C. Medio Comercial 65 g/L
PEPTONA UNIVERSAL	Nitrógeno aminico 3,5 % Tryptófano 1 – 2% cenizas de sulfato 15 %. compuestos fosforados 1%	pH : 6 - 7 Term. Optima 30 °C
EXTRACTO DE LEVADURA	Extracto de levadura 5 g, Glucosa 10 g, agar-agar 20 g	pH : $6,5 \pm 0,2$ Temp. Optima 32 °C Medio comercial 65 g/L
EXTRACTO DE PROTEÍNA	Bacto® Peptona	Temp. Optima 30 °C

Fuente: Merck. Manual de medios de cultivo, 1996.

1.4 MODELAMIENTO CINÉTICO

Se define la fermentación como aquel proceso en el que un sustrato es transformado en un producto bajo la acción de microorganismos, dicho proceso se lleva a cabo en condiciones determinadas que favorecen este accionar. Durante la fermentación el sustrato se consume, los microorganismos crecen y se multiplican y el producto se forma. La biocinética de las fermentaciones estudia los procesos de consumo de sustrato, de formación de biomasa y de biosíntesis de productos.

En la industria la mayoría de las fermentaciones son por lotes (cultivo batch) y se realiza en aparatos generalmente cilíndricos, que garantizan las condiciones óptimas para obtener los más altos rendimientos de producto. Estos aparatos se llaman reactores biológicos o biorreactores, y existen muchas variaciones entre ellos, todas adaptadas a necesidades prácticas particulares [11].

Los procesos de fermentación que transcurren dentro de los biorreactores son bastante complejos, ya que involucran procesos biocinéticos, de transferencia de masa y de calor, y en caso de biorreactores de gran tamaño, fenómenos hidrodinámicos [18].

Para analizar el régimen de trabajo de los biorreactores y su diseño, es necesario entonces utilizar modelos matemáticos. El modelo matemático es desarrollado partiendo de un régimen ideal de mezclado y a partir de ecuaciones diferenciales consistentes para la biomasa, el sustrato y el producto.

Una de las principales etapas del modelamiento de un reactor biológico es la etapa de elaboración del modelo biocinético. La ecuación para la acumulación de biomasa esta basada regularmente en el modelo de Monod, el cual describe la velocidad de crecimiento del microorganismo y la influencia sobre éste de las condiciones del medio.

Los microorganismos toman los nutrientes del medio y lo utilizan para llevar a cabo todas sus funciones metabólicas: mantenimiento, crecimiento, reproducción y biosíntesis de metabolitos. En muchos casos el producto de las fermentaciones industriales es la biomasa, pero en la gran mayoría de los esquemas de producción de sustancias de alto valor agregado por fermentación, una vez que se verifica el crecimiento de la biomasa se favorece la biosíntesis de un metabolito como producto.

Los productos comerciales fermentados son clasificados por Scragg² en tres casos [16] :

- 1) En el primer caso, el microorganismo elabora el producto, el cual permanece intacto y puede ser un ácido orgánico, un alcohol, una enzima u otra proteína, un aminoácido, una vitamina o un antibiótico.
- 2) En el segundo caso, el producto es el mismo microorganismo. Por ejemplo la levadura de panadería y algunas vacunas.
- 3) En el caso final, el microorganismo convierte durante un proceso de biotransformación una sustancia en otra de mayor rentabilidad económica, tal es el caso de los esteroides.

1.4.1 Modelos cinéticos de procesos simples. El proceso de planteamiento del modelo matemático de una fermentación, usualmente proviene de un esquema simplificado de la reacción derivada del conocimiento de la ruta metabólica involucrada. Cada etapa de la reacción metabólica es caracterizada por la reacción estequiométrica en un lado y por el flujo de transferencia, representado por la velocidad de reacción, en el otro. Ésta última etapa es generalmente

² Scragg, A. H. Aerobic batch culture of *Saccharomyces cerevisiae* using 2% glucose as a carbon source in Biorreactors in Biotechnology, 1991. Citado por HENSIRISAK, Patcharee. "Scale up the use of a microbubble dispersion to increase oxygen transfer in aerobic fermentation of Baker's yeast". Tesis instituto Politécnico de Virginia. Estados Unidos, 1997.

aproximada por el uso de una de las relaciones derivadas de la teoría de enzimas o reacciones químicas. La Tabla 10 resume las relaciones más frecuentemente empleadas para describir la dinámica de un sub-sistema metabólico individual.

Tabla 10. Resumen de las relaciones frecuentemente usadas para expresar cinéticas simples en el modelo de simulación de procesos de fermentación.

Tipo	Relación	Fenómeno controlante	Particularidades del modelo cinético
1	$r_1 = \kappa S$	Difusión	Relación lineal entre la velocidad del fenómeno y la concentración del sustrato. Propio de procesos de eliminación celular.
2	$r_2 = \kappa S^\eta$	Adsorción física	Derivado de la obtención de isothermas de absorción sobre superficies sólidas. Característico de la mayoría de las reacciones hidrolíticas.
3	$r_3 = \frac{\kappa S}{K_s + S}$	Quimisorción	Modelo típico para procesos de fermentación. Quimisorción de un sustrato sobre un sitio activo tal como la molécula de una enzima.
4	$r_4 = \frac{\kappa S^\eta}{K_s + S^\eta}$	Quimisorción	Modificación del caso previo, donde más de un sitio activo está presente por molécula biocatalítica.
5	$r_5 = \kappa [1 - \exp(-S/K_s)]$	Fuerzas de disipación	Interpretación física del movimiento de un punto de masa a un circunvecino. Incorporación de trazas de elementos a la célula o a la pared celular.
6	$r_6 = \kappa \exp(-S/K_s)$	Disipación física	Modificación del tipo anterior, solucionado a partir de condiciones de frontera diferentes en la trayectoria metabólica. Inhibición incierta.
7	$r_7 = \frac{\kappa K_s}{K_s + S}$	Inhibición	Bloqueo reversible hipotético de los sitios activos por quimisorción de un sustrato. Retro-alimentación negativa en el esquema metabólico.
8	$r_8 = \frac{\kappa K_s}{K_s + S^\eta}$	Inhibición	Variante del tipo r_6 , derivado de la inhibición de un gran número de sitios activos de reacción. Característico de procesos de cuello de botella.

Fuente: QUINTERO R., Rodolfo. Ambientes computacionales para el diseño, optimización e innovación en procesos biotecnológicos, 1997. **Citado por:** MONTOYA G., Didier A. Y BERMÚDEZ S., Mónica Y. Modelamiento de la transferencia de oxígeno para el cultivo de microorganismos en un biorreactor de columna de burbujeo. Universidad Nacional de Colombia. Manizales 2003.

Donde:

κ = constante de velocidad máxima de reacción a concentración infinita de reactante [s^{-1}].

K_s = constante del sustrato en [kg / m^3].

η = parámetro cinético estipulado para el proceso.

S = concentración del sustrato en [kg / m^3].

La cinética de la mayoría de las reacciones enzimáticas se representa razonablemente bien mediante la *ecuación de Michaelis-Menten* (tipo 3), la cual no exhibe las limitantes e imprecisiones de representaciones como las de Eisenthal y Cornish-Bowden [31].

1.4.2 Modelos de crecimiento microbial. El crecimiento de células microbiales puede ser visto desde varias perspectivas y con diferentes grados de complejidad, dependiendo si distinguimos entre células individuales dentro de un reactor o ya sea que examinemos la reacción metabólica individual ocurriendo dentro de la célula. Si bien el modelo más realista del crecimiento de una población microbial considera todas las ecuaciones que ocurren al interior de cada célula y las variaciones de célula a célula en la población, un modelo como este puede resultar inmanejable. Debemos hacer algunas simplificaciones, la magnitud de éstas depende del propósito del modelo a utilizar.

Se deben hacer las siguientes distinciones en la descripción de los modelos de crecimiento celular. Cuando la población está diferenciada dentro de células individuales que son disímiles una de otra en términos de alguna característica distinguible, el modelo es “*segregado*”. Por otro lado, el modelo “*no segregado*” considera la población como un conglomerado (cúmulo) dentro de una “*biofase*” la cual interactúa con el ambiente externo, y puede ser vista como una “*especie*” en solución, así la concentración celular es descrita por una sola variable. Los modelos no segregados tienen la ventaja que son matemáticamente simples.

La utilidad de los modelos segregados depende de la habilidad experimental para distinguir las células dentro de una población. Con frecuencia esto es difícil.

La consideración de los detalles de las reacciones que ocurren al interior de la célula, lleva al concepto de *estructura*. Los modelos *estructurados* consideran las reacciones individuales o grupos de reacciones que ocurren dentro de la célula; mientras que los modelos *no estructurados* simplemente analizan la célula como un ente en solución el cual interactúa con su entorno.

Un nivel adicional de complejidad resulta cuando se considera que los modelos pueden ser de naturaleza *aleatoria* o *determinística*. Un modelo aleatorio considera la distribución de la célula por características de interés, por ejemplo, el tiempo de generación de una población celular puede originarse de diferentes muestras de tiempos de generación de células individuales en una población y calcular una distribución de tiempos de generación basados en la muestra.

El modelo aleatorio, sin embargo es solamente útil para situaciones en las cuales el número de células es muy pequeño y la distribución de las características celulares llegan a ser importantes. Por otro lado, los modelos determinísticos ofrecen salidas que son completamente determinadas por las variables de entrada del modelo y en consecuencia, no son consideradas las variaciones aleatorias en las propiedades del sistema.

Los modelos determinísticos son los más comunes y útiles y sólo se consideraran modelos semejantes en las siguientes secciones [42].

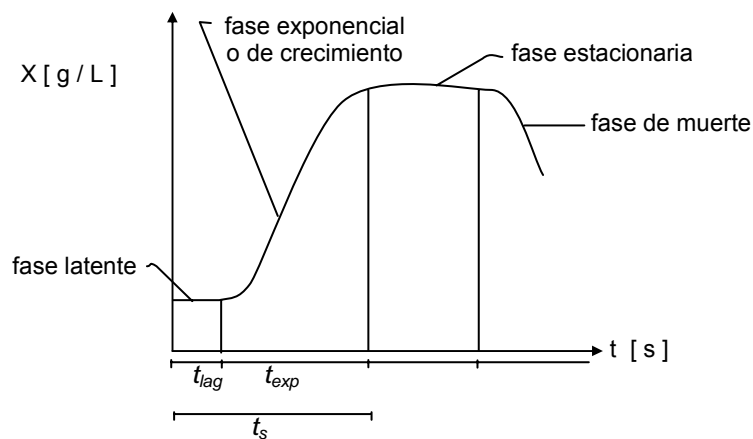
1.4.3 Fases del ciclo de crecimiento en un cultivo por lotes. Cuando las células microbiales son inoculadas en un reactor por lotes que contienen un medio de cultivo fresco y su incremento en la concentración es monitoreado, se observan diferentes fases de su crecimiento.

Hay una fase de *retardo* (latencia) inicial, la cual es de duración variable. Esta es seguida por la fase de *crecimiento exponencial*, donde el número de células (en base seca) incrementa exponencialmente. Esta es también conocida como la fase logarítmica, cuyo nombre proviene del método común de graficación del logaritmo del número de células frente al tiempo.

Posteriormente hay una corta fase de declinamiento en la fase de crecimiento y se establece la fase *estacionaria*, en donde el número de células es el mayor alcanzado durante el proceso.

Finalmente el número de células decrece durante la fase de *muerte*. Estas fases son ilustradas en la Figura 3.

Figura 3. Curva típica de crecimiento celular.



La fase de latencia es el resultado de diversos factores. Cuando las células son sembradas en un medio fresco, cofactores a nivel intracelular, vitaminas aminoácidos y iones (Mg^{2+} , Ca^{2+} , etc) son transportados a través de la membrana celular con lo que sus concentraciones en el medio pueden decrecer apreciablemente. Si se requiere intermediarios para las rutas metabólicas de la actividad enzimática, la dilución de estos reduce la velocidad a la cual operan

dichas rutas. Las células deben metabolizar las fuentes de carbono disponibles a fin de reabastecer su energía intercelular antes de iniciar la división celular.

Igualmente si el inóculo está creciendo en un medio que contiene una fuente de carbono diferente a la del nuevo medio, las nuevas enzimas requieren ser inducidas a catabolizar el nuevo sustrato, lo que también contribuye a el retardo en el crecimiento celular. El punto en el ciclo de crecimiento desde el cual el inóculo es extraído, también es importante. Las células tomadas de la fase exponencial y usadas como inóculo, generalmente presentan una fase de latencia menor que las tomadas de fases posteriores. Este inóculo extraído de la fase exponencial tiene concentraciones adecuadas de intermediarios y puede no sufrir el efecto dilución.

Si un inóculo es sembrado en un medio “rico”, con un contenido de aminoácidos y fuentes de carbono y nitrógeno complejas, el resultado es una corta fase de latencia debido a que los intermediarios están ya provistos en el caldo.

Cuando las células son sembradas en un medio que contiene diversas fuentes de carbono, puede obtenerse diferentes fases de latencia. Esto es conocido como “crecimiento diauxico”. Las células usan preferiblemente una fuente de carbono antes de consumir la segunda, debido a la represión catabólica que las enzimas experimentan al metabolizar la segunda fuente de carbono; además puede presentarse algún tipo de inhibición. Sonnleithert y Koppeli [35] explican en detalle fenómenos como inhibición por sustrato, represión catabólica, inhibición por producto y efecto glucosa basados en el estudio de levaduras.

La división celular ocurre en la fase exponencial. La velocidad a la que incrementa el número de células (N) es proporcional al número de células iniciales. Las células incrementan mediante una progresión geométrica $2^0, 2^1, 2^2 \dots 2^m$ hasta m divisiones. Por ejemplo si el número de células iniciales es N_0 , el número después de m generaciones es $2^m N_0$.

En vez del número de células, con frecuencia es más conveniente usar el peso de células secas por volumen (X) como una medida de la concentración celular. Durante la fase exponencial en un reactor por lotes la variación de la biomasa se describe por:

$$\frac{dx}{dt} = \mu X \quad (1.1)$$

Donde μ es la velocidad de crecimiento específico de las células.

La ecuación anterior puede integrarse desde el final de la fase de latencia ($X=X_0$ y $t=t_{lag}$) para cualquier punto en la fase exponencial (X,t).

$$X = X_0 e^{\mu(t-t_{lag})} \quad 0 \quad \ln\left(\frac{X}{X_0}\right) = \mu(t - t_{lag}) \quad (1.2)$$

El tiempo requerido por el número de células o peso seco para duplicarse, conocido como tiempo de *duplicación* t_d , está relacionado con la velocidad de crecimiento específico por:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (1.3)$$

Ocasionalmente se da que el tiempo duplicante para el número de células y las células en peso seco difieren, como resultado de la inconsistencia de la masa celular por célula. Sin embargo, se puede definir la velocidad del crecimiento específico del número de células (v en h^{-1}) separadamente de (μ) como sigue:

$$v = \frac{1}{N} \frac{dN}{dt} \quad \mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (1.4)$$

Cuando μ y v son iguales, se dice que se tiene un *crecimiento balanceado*. En el cual existe un adecuado abastecimiento de todos los nutrientes no limitantes del desarrollo celular, tal que la composición de la célula permanece constante, aún cuando la concentración de todos los otros nutrientes (limitantes) decrecen.

Por otro lado, cuando el crecimiento no es balanceado, ocurren variaciones en la composición de la célula (contenido de proteínas, viabilidad, etc). Si bien la velocidad de crecimiento del número de células puede ser constante, la velocidad de crecimiento de la masa celular es variable.

A bajas concentraciones de nutriente, se establece que la velocidad de crecimiento específica depende de la concentración de nutrientes. A altas concentraciones, la velocidad de crecimiento específica alcanza valores máximos, fijados por la cinética intrínseca de las reacciones intracelulares, las cuales están relacionadas en la transcripción y traslación del DNA. El final de la fase exponencial se presenta cuando algún nutriente esencial, por ejemplo la fuente de carbono o nitrógeno es agotado, o cuando un metabolito tóxico se acumula a un nivel suficiente como para inhibir el crecimiento.

Aun si son empleadas muy altas concentraciones de nutrientes, la acumulación de metabolitos tóxicos limita la concentración de las células que pueden llegarse a alcanzar en la fase exponencial. En un biorreactor por lotes esta limitación puede superarse reteniendo las células por filtración, también manteniendo un flujo continuo de nutrientes y remoción de los productos.

Concluida la fase exponencial, la velocidad de crecimiento decrece (declinamiento) lo que es seguido por la fase estacionaria. La duración de la fase estacionaria puede variar con el tipo de célula, las condiciones previas al crecimiento etc. Algunas células pueden liberar o producir nutrientes que pueden ser consumidos por otras células y así mantener la población celular.

Finalmente está la fase de muerte, En ésta fase las células cesan la liberación de nutrientes y la población decrece. Los metabolitos intracelulares son barridos por diferentes sistemas de enzimas dentro de la célula y los metabolitos tóxicos se acumulan.

La velocidad a la que declina el crecimiento es también exponencial y puede representarse mediante la ecuación:

$$\frac{dX}{dt} = -K_d X \quad (1.5)$$

Los modelos de mayor importancia son los que relacionan la velocidad de crecimiento específica (μ) con la concentración de sustrato y otras variables externas. La simplificación de estos no consideran las diversas fases del ciclo de crecimiento, pero predicen la velocidad de crecimiento en la fase exponencial. Es posible considerar modelos mas complicados.

1.4.4 Modelos de crecimiento no estructurados. Las relaciones simplificadas que describen el crecimiento exponencial son modelos no estructurados. Estos modelos analizan la célula como una simple especie en solución y describen la cinética del crecimiento celular basados en los perfiles de concentración de las células y los nutrientes. Los primeros modelos que se desarrollaron para el crecimiento celular no tienen en cuenta la dependencia de la velocidad de crecimiento exponencial con la concentración de nutrientes. Tales modelos tienen hoy día aplicabilidad cuando el sustrato limitante del crecimiento no esta identificado. El modelo más simplificado es el Malthus descrito como:

$$r_x = \mu X \quad (1.6)$$

Donde r_x es la velocidad volumétrica de incremento celular en peso seco (el cual puede abreviarse como DCW) en g DCW / L-h y μ (h^{-1}) es constante. Este modelo predice un crecimiento ilimitado con el tiempo (crecimiento “Malthusiano”).

Según Blanch y Douglas [5], para proveer de un recurso que limitara el crecimiento, Verlhulst (1844) y después Pearl y Reed (1920) propusieron la adición de un término inhibidor el cual es dependiente de la concentración celular:

$$r_x = kX(1 - \beta X) \quad (1.7)$$

El cual para un sistema por lotes puede escribirse como:

$$\frac{dX}{dt} = r_x \quad \text{y así} \quad X = \frac{X_o e^{kt}}{1 - \beta X_o (1 - e^{kt})} \quad (1.8)$$

Donde $X=X_0$ a $t=0$. Este resultado es conocido como la *ecuación logística*. La máxima concentración celular alcanzada en tiempos largos es $1/\beta$, y la velocidad inicial de crecimiento es aproximadamente exponencial. El parámetro β es por lo general considerablemente menor que la unidad.

1.4.5 El modelo de Monod. Uno de los modelos simplificados que incluye el efecto de la concentración de nutrientes es el modelo desarrollado por Jacques Monod, basado en observaciones del crecimiento de *E. Coli* en varias concentraciones de glucosa. Este modelo asume que sólo un sustrato (el sustrato limitante de la velocidad del crecimiento, S) es relevante en la determinación de la velocidad de proliferación de la célula. La forma de la ecuación de Monod es similar a la cinética enzimática de Michaelis-Menten; si en realidad el transporte del sustrato a la célula es limitado por la actividad de una permeasa, el crecimiento celular puede ser descrito de la forma:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S} \quad (1.9)$$

Así para un crecimiento por lotes a un volumen constante:

$$\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S} X \quad (1.10)$$

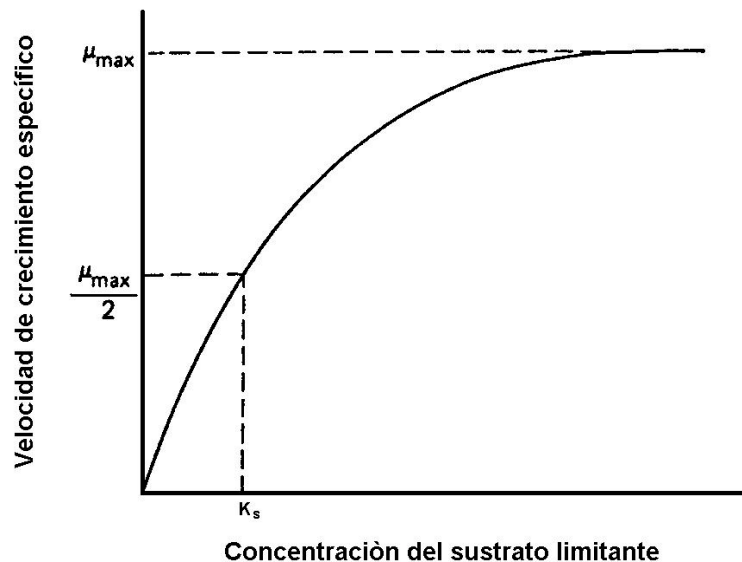
Donde μ_{\max} es la velocidad específica máxima de crecimiento de las células y K_s la constante del sustrato, que es el valor de la concentración de nutriente cuando la velocidad de crecimiento específica está a la mitad de su máximo valor.

Esta ecuación presenta dos formas de limitante. A concentraciones altas de sustrato, $S \gg K_s$ y la ecuación anterior se reduce a una ecuación con dependencia de orden cero en relación a la concentración de sustrato. A concentraciones bajas, $S \ll K_s$ lo que resulta en una dependencia de primer orden.

$$\mu = \mu_{\max} \quad \text{para} \quad S \gg K_s \quad \text{y} \quad \mu = \frac{\mu_{\max}}{K_s} S \quad \text{para} \quad S \ll K_s$$

Los resultados típicos de la dependencia de la velocidad específica de crecimiento con la concentración de sustrato son representados en la Figura 4

Figura 4. Influencia de la concentración de sustrato limitante en la velocidad de crecimiento específico.



Los valores de μ_{\max} varían con el tipo de microorganismo y el valor de K_s depende de la naturaleza del sustrato. Burgos – Rubio *et.al.*[7], establecieron una gran variedad de mecanismos en la descripción y análisis de las rutas metabólicas para la conversión de diferentes sustratos a ácido láctico y células. De igual manera plantearon ecuaciones para diferentes factores de inhibición. La Tabla 11 resume los valores de μ y K_s obtenidos en su trabajo.

Tabla 11. Parámetros cinéticos en experimentos batch a 42°C y pH 5,6 usando *L. bulgaricus*.

Sustrato	Velocidad de crecimiento específico (h^{-1})	Rendimiento de crecimiento (g cel / g sustrato)	Tiempo de residencia (h)
Lactosa	0,98	0,097	7,5
Glucosa	0,96	0,093	8,0
galactosa	0,76	0,081	9,5

Fuente: BURGOS-RUBIO, Concepción N.; OKOS, Martín R.; WANKAT, Phillip C. "Kinetic study of the Conversion of Different Substrates to Lactic Acid Using *Lactobacillus bulgaricus*". Biotechnol. Prog. 2000, 16, p 305 – 314.

Los valores de K_s son generalmente bastante pequeños, lo que implica que la velocidad específica de crecimiento permanece cerca de su máximo valor durante gran parte del periodo de crecimiento por lotes. Esta aparente dependencia de orden cero con la concentración de sustrato justifica el termino "crecimiento exponencial".

Con el propósito de lograr la representación de los datos experimentales con un mayor grado de ajuste, diferentes investigadores han propuesto otros modelos como alternativa a la ecuación de Monod. Entre ellos se encuentran el modelo de Moser; modelo de Contois y Fijomoto; modelo de Teissier; modelo de Konak; modelo de Kargi y Shuler; modelo de Meyrath [4, 12].

1.4.6 Otros modelos constitutivos del crecimiento celular.

➤ **Modelo cinético del consumo de sustrato.** Las células consumen sustrato del medio ambiente y lo canalizan en diferentes rutas metabólicas. Parte del sustrato puede utilizarse directamente en el crecimiento y en la síntesis de producto, mientras que otra parte se utiliza para generar la energía necesaria para las actividades de mantenimiento. El sustrato requerido para el mantenimiento varía considerablemente dependiendo del organismo y del medio de cultivo.

De este modo, una estimación completa del consumo de sustrato debe incluir un componente de mantenimiento. La velocidad específica de consumo de sustrato para actividades de mantenimiento se conoce como el *coeficiente de mantenimiento*, m_s .

Tanto para cultivos en los que no existe formación de producto extracelular (por ejemplo en la fabricación de levadura de panadería y de proteínas de origen unicelular), donde se supondrá que todo el sustrato que entra a la célula se utiliza para el crecimiento y funciones de mantenimiento, como para modelos en los que el producto está asociado con el crecimiento microbiano, las velocidades de consumo de sustrato, crecimiento celular y mantenimiento se relacionan de la siguiente manera:

$$r_s = \frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \frac{dX}{dt} + m_s X \quad (1.11)$$

En cultivos con formación de producto no asociada con el crecimiento microbiano, la relación entre las velocidades (consumo de sustrato, crecimiento celular, formación de producto y mantenimiento) es:

$$r_s = \frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \frac{dX}{dt} + \frac{r_p}{Y_{P/S}} + m_s X \quad (1.12)$$

Donde r_p y $Y_{P/S}$, velocidad de formación de producto y rendimiento de sustrato en producto respectivamente, son tratados posteriormente.

En la ecuación (1.12), $Y_{X/S}$ es el rendimiento de sustrato en biomasa, el cual provee una medida de la eficiencia del nutriente para soportar biosíntesis. Su valor elevado favorece la productividad del proceso y disminuye el costo de remoción de calor. Este coeficiente econométrico da la idea de cuánta biomasa se puede formar por cada unidad de masa del sustrato.

Generalmente, cuando el sustrato es el factor limitante del crecimiento, la cantidad de biomasa producida es proporcional a la cantidad de fuente de carbono consumida y su rendimiento en sustrato puede definirse de la siguiente manera:

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{X - X_0}{S - S_0} \quad (1.13)$$

Siendo X_0 y S_0 las concentraciones iniciales de biomasa y sustrato, respectivamente.

➤ **Modelo cinético de la formación de producto.** De acuerdo con la relación cuantitativa entre la cantidad de producto y el crecimiento de biomasa puede darse el caso que la formación de producto esté directamente asociada con el crecimiento, que no haya una relación entre el crecimiento y la formación de producto o que exista una relación parcial entre el crecimiento y la formación de producto[12].

➤ **Formación de producto asociada al crecimiento microbiano.** Algunas de las ecuaciones que describen la formación de producto son:

$$r_P = \frac{dP}{dt} = Y_{P/X} \frac{dX}{dt} \quad (1.14)$$

$$r_P = Y_{P/S} \frac{dS}{dt} \quad (1.15)$$

Donde $Y_{P/S}$ es el rendimiento de sustrato en producto y $Y_{P/X}$ es el rendimiento de biomasa en producto, los cuales se definen como:

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad (1.16)$$

$$Y_{P/X} = \frac{\Delta P}{\Delta X} = \frac{P - P_o}{X - X_o} \quad (1.17)$$

Siendo P_o la concentración inicial del producto.

➤ **Formación de producto no asociada al crecimiento microbiano.**

Generalmente, esta cuantificación es una tarea difícil. En algunos casos se ajusta a los datos obtenidos experimentalmente.

La expresión se da como:

$$r_P = X K_P \quad (1.18)$$

Donde:

r_P = velocidad de formación de producto

K_P = constante de velocidad para formación de producto [$g_{\text{producto}} / (g_{\text{células}} \cdot h)$]

➤ **Formación de producto parcialmente asociada al crecimiento.** El modelo propuesto por Luedeking y Piret es una combinación de las ecuaciones. (1.18) y (1.14).

$$r_P = \frac{dP}{dt} = Y_{P/X} \frac{dX}{dt} + X K_P \quad (1.19)$$

2. DISEÑO METODOLÓGICO

LUGARES DE TRABAJO

Procedimientos microbiológicos. Reconstitución y activación del microorganismo
Laboratorios de bacteriología de la Universidad Católica.

Determinación del crecimiento celular. Laboratorio Análisis de Aguas y Alimentos.

Etapas experimental (fermentación). Laboratorios de Procesos Productivos de la Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales.

2.1 MATERIALES Y EQUIPOS

Tabla 12. Materiales empleados en el procedimiento experimental para la obtención de ácido láctico a partir de jarabe de glucosa..

Reactivos	Casa comercial
Glucosa	Carlo Erba al 99,9%
Ácido láctico	Galactic (Anexo B)
Jarabe de glucosa	Industrias del Maíz (Maizena).
Extracto de proteína (Bacto [®] pectona)	Difco
Extracto de levadura	Difco
Extracto de malta	Oxoid
Carbonato de calcio	Grado reactivo
Hidróxido de sodio	Carlo Erba grado reactivo
Fosfato de potasio	Grado reactivo
Fosfato amonico	Grado reactivo
Ácido Dinitro Salicílico (DNS)	Carlo Erba grado reactivo
Tartrato de sodio y potasio	Mol Labs grado reactivo
Bisulfito de sodio	Carlo Erba grado reactivo
Ácido sulfúrico	Grado reactivo (puro)
Caldo MRS	Merck
Agar MRS	Merck
Glicerol al 10%	Grado reactivo

En la Tabla 13 se presenta la composición del caldo y agar de MAN ROGOSA SHARPE (MRS) para el enriquecimiento del cultivo y aislamiento de todas las especies *Lactobacillus* [23].

Tabla 13. Composición del caldo y agar MRS

CALDO DE CULTIVO	COMPOSICIÓN [g /L]	PREPARACIÓN
Caldo MRS	Peptona universal 10,0 Extracto de carne 5,0 Hidrogeno fosfato dipotasico 2,0 Tween 80 1,0	Disolver 50 g/L, esterilizado en autoclave (15 minutos a 121-124°C), con un pH de 6,5,
Agar MRS	Hidrogencitrato diamónico 2,0 Acetato sódico 5,0 Sulfato de magnesio 0,1 Agar-agar 12,0 (ausente en el calo MRS).	Disolver 62 g/L, esterilizado en autoclave (15 minutos a 121-124°C), con un pH de 5,5,

Fuente: Merck. Manual de medios de cultivo, 1996.

Cepa utilizada. La cepa utilizada fue *Lactobacillus delbrueckii subespecie (bulgaricus)*, suministrada por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. En el Anexo C se suministra la información sobre los contactos respectivos de éste laboratorio.

2.1.1 Equipos de análisis.

- Espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 20 (Rango 200-1100 nm)
- pH-metro Schoot Handy Lab 1 (Precisión 0,1 unidades de pH)

- Refractómetro Extrech, escala 0 – 32 °Brix
- Cámara de neubauer

2.1.2 Equipos de proceso.

- Biofermentador P 100 / P 140 / P 310
- Balanza Analítica Kern (Precisión 0,1 mg)
- Baño termostático Eterna con control PID (Rango 0-200°C y precisión 0,1°C)
- Incubadora
- Autoclave
- Cámara de anaerobiosis
- Nevera Icasa

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Métodos Analíticos. Se utilizaron procedimientos analíticos para la caracterización del jarabe de glucosa, determinación de azúcares reductores y ácido láctico.

➤ **Caracterización del jarabe de glucosa.** La Tabla 14 lista los métodos empleados para la caracterización del jarabe de glucosa comercial utilizado como fuente de carbono para la fermentación.

Tabla 14. Métodos empleados para la caracterización del jarabe de glucosa.

Parámetros	Método
° Brix	Refractometría
pH	Potenciometría
Densidad [g/mL]	Picnometría
Azúcares Reductores (en 100 g de muestra)	Espectrofotometría

En la Tabla 15 se registran los parámetros de la caracterización del jarabe de glucosa suministrada por la empresa Super de Alimentos S.A.

Tabla 15. Caracterización del jarabe de glucosa.

Parámetro	Resultado
Grados Brix (20 °C)	82,8 – 83,9
Grados Baume	43 – 43,5
Contenido sulfitos (SO ₂)	100 – 250 ppm
Dextrosa Equivalente DE	38 – 42
pH	4,8 – 5,2
Viscosidad (cP)	2610
Recuento total de microorganismos Mesófilos aerobios	[UFC/g] 500 máx
Recuento total levaduras y hongos	[UFC/g] 250 Máx
E, Coli y Salmonella	Negativo
Bacterias coliformes	[NMP/g] Menor de 3

Fuente: Industrias del Maíz (Maizena). Cali - Colombia.

➤ **Determinación de azúcares reductores.** La curva patrón de azúcares reductores fue determinada por el método colorimétrico modificado DNS (ácido dinitrosalicílico) y lectura de absorbancia en un espectrofotómetro a 540 nm, como se señala en el (Anexo A) [26].

➤ **Determinación de ácido láctico.** La curva patrón de ácido láctico se determinó por el método colorimétrico del cloruro férrico (FeCl₃) y lectura de absorbancia en un espectrofotómetro a 440 nm (Anexo B) [15].

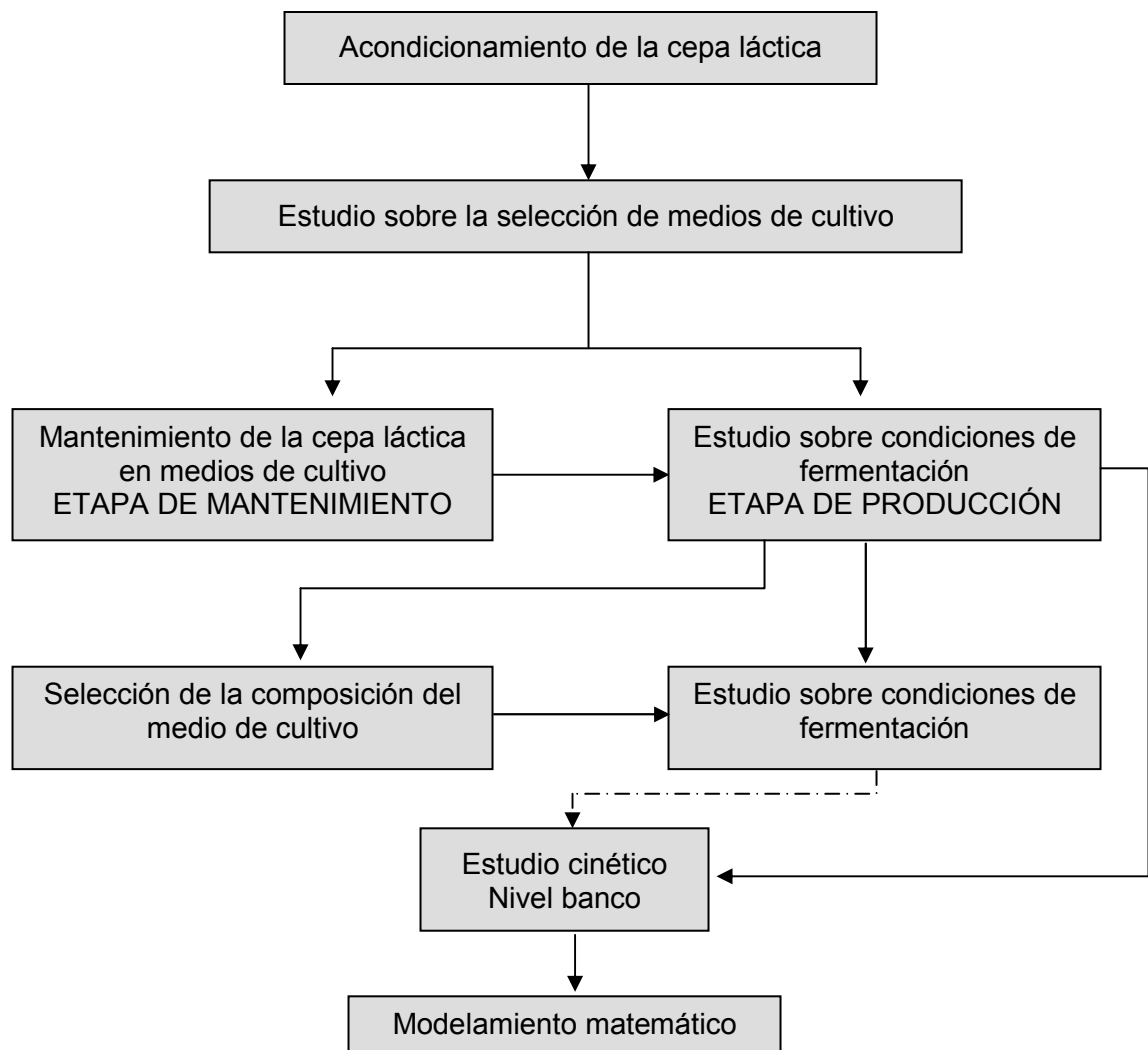
➤ **Crecimiento celular.** Se utilizó el método de recuento de células por cámara de Neubauer que permite determinar el número de unidades infectivas por unidad de peso o volumen, como se describe en el Anexo F [39].

2.2.2 Procedimiento general. Con el propósito de evidenciar la obtención de ácido láctico por fermentación de glucosa y establecer los parámetros cinéticos involucrados en el proceso, el presente estudio fue dividido en tres fases:

- 1) En base a los datos reportados en la bibliografía se hizo un diseño experimental que consistió en combinar las concentraciones de los nutrientes del caldo de fermentación, a fin de establecer el caldo de cultivo que favoreciera el rendimiento en ácido láctico y en consumo de glucosa.
- 2) Una vez determinado el mejor caldo de cultivo, se realizó en éste la fermentación durante un periodo de 68 h, tomando muestras cada 4 horas. Con los datos obtenidos experimentalmente se determinaron los perfiles de crecimiento celular, consumo de sustrato y aparición de producto.
- 3) A partir de los datos experimentales se obtuvieron los parámetros cinéticos requeridos por el modelo matemático para la simulación del sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias que describen el comportamiento teórico del proceso fermentativo por lotes.

La Figura 5 presenta el diseño esquemático global del desarrollo de la fermentación de jarabe de glucosa para la obtención de ácido láctico.

Figura 5. Diseño esquemático global del desarrollo de la fermentación



Fuente: SÁNCHEZ G., Valentina; AGUDELO M., María A. Obtención de ácido itacónico por fermentación con *Aspergillus Terreus*. Universidad Nacional de Colombia. Manizales, 1999.

La línea punteada indica que la etapa de llegada depende directamente de los resultados que sean obtenidos durante la etapa de salida.

Las etapas involucradas en la Figura 5 son detalladas a continuación.

2.3 PREPARACIÓN DE LA CEPA DE *LACTOBACILLUS DELBRUECKII* NRRL B-763

Se realizó una búsqueda bibliográfica con el fin de determinar las instituciones que poseían cepas de la bacteria *Lactobacillus delbrueckii* especialmente seleccionada para la producción de ácido láctico a partir de glucosa. La cepa que se obtuvo finalmente es la de *Lactobacillus delbrueckii* (NRRL B-763), donada por el ministerio de Agricultura de los Estados Unidos.

Debido a que la cepa fue enviada en estado liofilizado, ésta se encuentra en estado latente e inactiva, ya que debido a la ausencia de humedad y nutrientes no puede desarrollar su metabolismo normal. En éste estado, la bacteria puede conservarse durante periodos prolongados de tiempo.

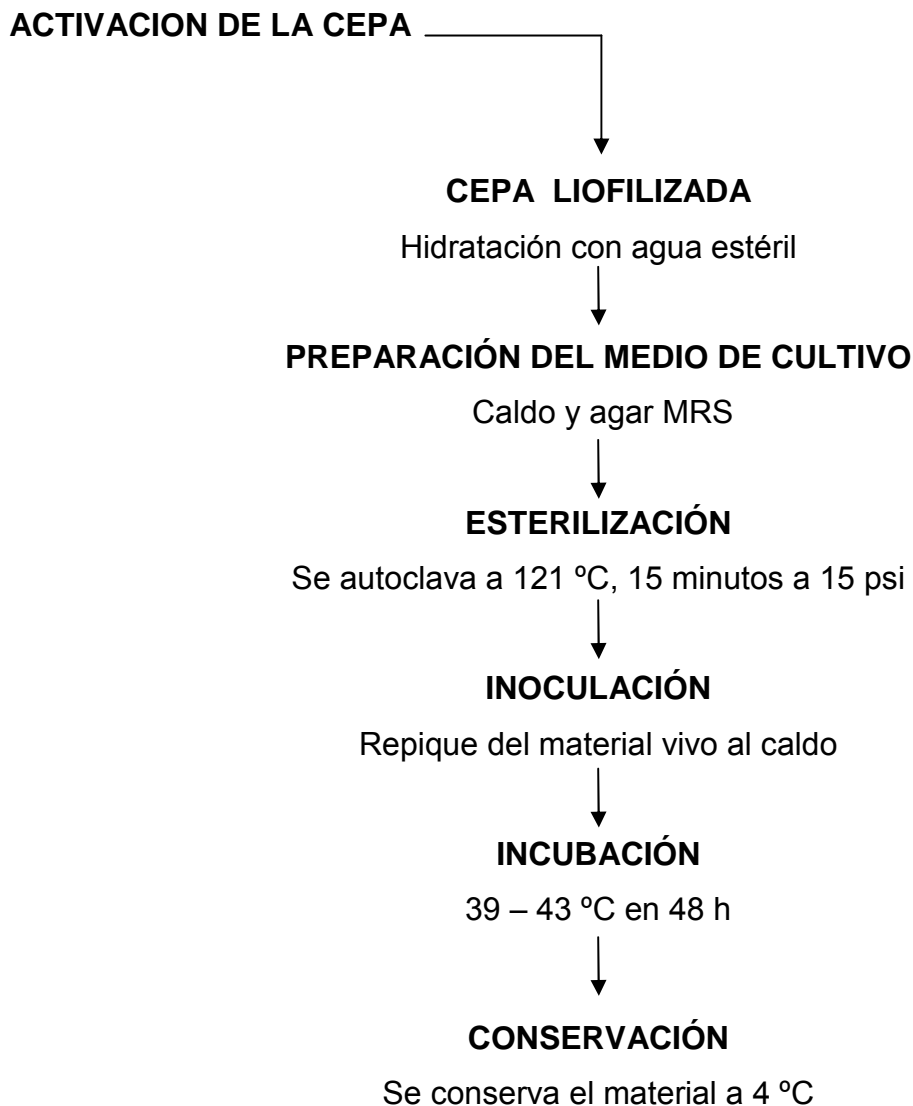
Para poder llevar la cepa de su estado latente a un estado donde se pueda desarrollar y reproducir se hace necesaria la activación de la cepa, adaptarla para su mantenimiento en medio semisólido y líquido y conservarla para su utilización durante todo el estudio.

Ya que el microorganismo es incapaz de exhibir sus capacidades biosintéticas inmediatamente después de su activación e inclusive puede morir o modificarse, debe realizarse una etapa de mantenimiento de la cepa con el fin de disponer de material de siembra fresco y listo para la etapa de fermentación.

La conservación de la cepa es un procedimiento muy importante que permite disponer en todo momento de la cepa original en estado latente.

La Figura 6 exhibe el diagrama de flujo para la preparación de la cepa *Lactobacillus delbrueckii*, que puede ser generalizado empleando cualquier tipo de cepa.

Figura 6. Diagrama de flujo para la preparación de la cepa.



La ejecución global de todos los procedimientos para la preparación de la cepa incluye cuatro fases, las cuales se llevan a cabo en forma secuencial [41].

➤ **Esterilización.** Una vez preparado el medio o caldo de cultivo se efectúa la esterilización, la cual se lleva a cabo en volúmenes pequeños repartiendo el total del volumen a esterilizar, o hasta donde sea posible en los recipientes en los que posteriormente se realizará la inoculación.

La esterilización se realiza en autoclave a 121°C, durante 15 min a 15 psi de presión. Considerando un tiempo global que incluya el periodo de calentamiento y enfriamiento, se llevó a cabo el proceso durante unos 30 min.

➤ **Inoculación.** Esta etapa consistió en la siembra del material vivo en el medio de cultivo donde se va a desarrollar el crecimiento, bajo condiciones de asepsia para evitar la contaminación del cultivo. El procedimiento y las precauciones que se deben tomar para dicho procedimiento se tiene en cuenta a continuación.

- Se desinfectó previamente el mesón de trabajo con medios desinfectantes como alcohol o hipoclorito de sodio.
- Luego se rodeó el sitio con mecheros de gas, preferiblemente encendidos con anterioridad para la desinfección.
- La inoculación se llevó a cabo con aguja curva esterilizada a la flama.
- Normas de seguridad uso de tapabocas y guantes previamente desinfectados.

El procedimiento de inoculación se detalla en el Anexo D.

➤ **Incubación.** Posterior a la inoculación, el sistema se sometió a incubación a 43 °C en periodos de tiempo que dependen del rendimiento en el crecimiento de la cepa.

➤ **Preservación del sistema:** Las condiciones de conservación se garantizaron con la exposición del sistema a enfriamiento a 4 °C inhibiendo de esta manera el crecimiento bacteriano y la actividad enzimática.

A continuación se describe el procedimiento metodológico para la preparación de la cepa *Lactobacillus delbrueckii* que incluye las tres etapas que se citaron anteriormente: activación, mantenimiento y conservación.

2.3.1 Activación de la cepa. El cultivo del *Lactobacillus delbrueckii*, se desarrollo a partir de un liofilizado (NRRL B-763), fue activado y sembrado haciendo repiques del material liofilizado en medio de cultivo agar y caldo MRS (De Man, Rogosa y Sharpe; 1960). Fue incubado en cámara de anaerobiosis a 39 °C por 48 h con pH entre 5,0 – 6,0, en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Católica. Las colonias fueron obtenidas en agar MRS (cajas de petri) por el método de agotamiento con el objeto de purificarlas y poder tener buen material de trabajo.

Las colonias obtenidas fueron sembradas en forma masiva en tubos con caldo MRS para ser conservadas en nevera (4 – 6 °C) por un tiempo de dos meses bajo la forma de cepas madre.

En la Tabla 13 de la página 56 se presenta la composición de los medios de cultivo empleados en la activación de la cepa.

La cepa liofilizada *NRRL B-763* fue enviada dentro de una ampolleta de vidrio, extrayendo su contenido en medio de condiciones de asepsia e incorporándolo dentro de tubos de ensayo tapa rosca que contenían el caldo de cultivo MRS preparado y esterilizado con anterioridad, y el cual se encontraba a temperatura ambiente.

2.3.2 Mantenimiento de la cepa y selección del medio de mantenimiento. El objetivo de esta etapa es la selección de los medios adecuados que garanticen un material de siembra fresco y listo para la etapa de fermentación y que brinde los requerimientos nutricionales de la cepa láctica, en su etapa de crecimiento, evitando la pérdida de las propiedades del microorganismo ante el agotamiento de los nutrientes.

Con base en las referencias bibliográficas y en las especificaciones de la Tabla 13 página 56, se efectuó la selección del medio de cultivo de Caldo MRS que garantiza el crecimiento y el normal desarrollo del lactobacilo en su etapa de mantenimiento.

Después de elegido el mejor medio, se preparó diluyendo la cantidad necesaria especificada en la Tabla 13, en un erlenmeyer con agua destilada agitando frecuentemente para disolver por completo el reactivo (caldo MRS). A continuación se taparon los erlenmeyer con gasa y algodón (con el fin de evitar la contaminación después de ser esterilizados) y se llevaron al autoclave a 121 °C durante 15 minutos hasta una presión de 15 psi. Cuando el erlenmeyer estuvo a temperatura ambiente se dispusieron en tubos tapa rosca con 10 ml cada uno, se usaron los necesarios para la inoculación y el resto de los tubos se refrigeraron a 4 – 6 °C para mantenerlos frescos a la hora de una próxima siembra.

El medio preparado anteriormente fue dispuesto en tubos los cuales se sembraron con la cepa de lactobacilo, posteriormente se llevaron a incubación a las temperaturas recomendadas de 39 a 43 °C durante 48 horas.

2.3.3 Conservación de la cepa. La conservación de la cepa se realizó con el fin de mantener las características físico-químicas de la especie, ya que ante continuos repiques, se puede ir perdiendo o contaminarse. Además es necesario preservar pura la especie para posteriores trabajos.

Para la preservación de la cepa, se prepararon tubos con medio inclinado (los que también fueron esterilizados), que se sembraron e incubaron de igual manera que la anterior. Después de cumplido el tiempo de incubación, los tubos de ensayo se llenaron con glicerol estéril al 10 % y se llevaron a la nevera a 4 °C con el fin de mantener la cepa viva durante todo el desarrollo del trabajo.

El método óptimo de preservación debe ser seleccionado para cada proceso y cepa en particular (Anexo E).

2.4 DETERMINACIÓN DEL MEDIO ÓPTIMO DE FERMENTACIÓN

La determinación del medio óptimo de fermentación se realizó utilizando un volumen de trabajo de 100 mL en un erlenmeyer de 250 mL, con el objeto de conservar una cabeza de aire sobre el caldo y reducir, así, la oxigenación del medio [29]. A partir de los resultados obtenidos en estos ensayos se establecieron las condiciones tanto de composición del medio como de operación para el montaje que se realizó en la etapa de fermentación a nivel banco en un biorreactor de 3 L.

Se requiere obtener la combinación entre los nutrientes del medio de cultivo que proporcione mayor rendimiento en la producción de ácido láctico y consumo de jarabe de glucosa.

La selección de la composición de nutrientes en el medio y la determinación de los factores a considerar en los ensayos experimentales, se basa en los datos de rendimientos obtenidos en estudios anteriores, donde se demuestra que tanto la formación de ácido láctico y la formación de biomasa dependen directamente de la fuente de carbono y nitrógeno y del tiempo de fermentación.

Cuando la cepa pasa del medio de mantenimiento en el que se encuentran los requerimientos nutricionales para su desarrollo a un estado de generación del producto deseado en el medio de producción, es necesario realizar una etapa de adaptación donde la cepa absorba sus nutrientes y desarrolle su crecimiento.

2.4.1 Etapa de adaptación. En esta etapa se realizó la adecuación de la bacteria láctica proveniente de un medio de mantenimiento (caldo MRS) a unas

nuevas condiciones en un cultivo iniciador (prefermentador) que a su vez sirve de inóculo para la fermentación.

Se prepararon cada uno de los 8 medios líquidos, con todos los nutrientes requeridos para la fermentación. Para la puesta en marcha de la cepa fue utilizado una parte del volumen de cada medio (20 mL). Luego de ajustar el pH entre 5,4 y 6,0, se procedió a esterilizar los medios. En el momento en que los erlenmeyer alcanzaron la temperatura ambiente se inocularon con 10 mL de cepa activada.

Para nuestro caso se estimó un tiempo de adaptación de 24 horas a 39 – 43 °C en un baño termostatado con agitación constante con el objetivo de obtener una elevada concentración de microorganismos. Luego del cultivo que resulta de esta etapa se realiza la inoculación en los medios (volumen restante) considerados dentro del diseño experimental, en este punto la cepa ya ha desarrollado su estructura y se encuentra en condiciones para producir ácido láctico.

2.4.2 Etapa de producción. En la ejecución de esta etapa se determinó la cantidad de ácido láctico producido por cada uno de los 8 tratamientos, y a partir de esto se determinó la composición óptima de los nutrientes del medio de fermentación. Con este fin se usó un diseño experimental de dos niveles y tres factores [24] donde se tomó el nivel alto y bajo de los valores reportados en la literatura [40]. La aplicación de este diseño experimental permitió determinar la combinación óptima de nutrientes en el medio líquido de cultivo.

Cuando los medios estuvieron dispuestos como se muestra en la Figura 7 se llevaron al baño termostatado, con agitación constante de 150 rpm para evitar la sedimentación del carbonato de calcio, se controló el pH y se mantuvo la temperatura entre 39 – 43°C durante 48 h, el cual se estima tiempo suficiente para el desarrollo del lactobacilo. Los medios base utilizados fueron los mismos empleados en la etapa de adaptación.

Figura 7. Fermentación de los medios de cultivo.



El procedimiento para preparar las muestras y poder aplicar los métodos para análisis de ácido láctico y glucosa fue el siguiente.

1. El caldo fermentado fue calentado hasta 70 °C por 15 minutos con el fin de inactivar las bacterias.
2. Se acidificó con ácido sulfúrico para precipitar las sales formadas.
3. Las sales precipitadas (sulfato de calcio) y la biomasa se removieron por filtración, y el licor activado fue usado para los análisis.

Este mismo procedimiento se aplicó para la réplica.

2.5 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EL MEJOR MEDIO DE CULTIVO

Para estudiar el efecto de los diferentes factores sobre la producción de ácido láctico se realizó un modelo factorial 2^k , que consistió en combinar las concentraciones de los nutrientes del caldo de fermentación, a fin de establecer el caldo de cultivo que favoreciera el rendimiento en ácido láctico y en consumo de

glucosa. Los factores involucrados en el proceso de fermentación de ácido láctico se señalan en la Tabla 16.

Tabla 16. Definición de los parámetros del proceso fermentativo.

PARÁMETRO		TIPO	RANGO	Ref.
Temperatura	Inoculación	Constante	43 °C	Anexo C
	Fermentación	Constante	39- 43 °C	[5]
pH		Constante	5,3	[5]
Tiempo	Inoculación	Constante	48 h	Anexo C
	Fermentación	Constante	48 h	[5]
Medio de Cultivo	Extracto de Levadura	Variable	A determinar	
	Extracto de Malta	Variable	A determinar	
	Extracto de Proteína	Variable	A determinar	
Concentración de Sustrato inicial		Constante	15 % P/V	[5]

El plan de experiencia factorial maneja dos niveles de diseño (2^k), los cuales pueden ser denotados como (+) para el nivel superior y (-) para el nivel inferior. La Tabla 17 ofrece las variables del medio de cultivo y su convención en el texto.

Tabla 17. Variables del plan de experiencia factorial.

VARIABLE		CONVENCIÓN	NIVEL	
			BAJO	ALTO
Medio de cultivo	Extracto de levadura	A	-	+
	Extracto de malta	B	-	+
	Extracto de Proteína	C	-	+

Para el diseño factorial 2^K se asume que hay linealidad entre sus niveles extremos (alto y bajo) debido a esto se toman un rango de valores que cubre el reportado por la literatura (valor medio).

La matriz de ensayos que indica los niveles en los cuales se deben realizar las experiencias se construye con las tres variables así:

Tabla 18. Matriz del diseño factorial 2^3 .

Corrida	A	B	C	Combinaciones de tratamientos
1	-	-	-	(1)
2	+	-	-	a
3	-	+	-	b
4	+	+	-	ab
5	-	-	+	c
6	+	-	+	ac
7	-	+	+	bc
8	+	+	+	abc

Este modelo dará el valor adecuado de las concentraciones de los nutrientes (extractos de levadura, malta y proteína) del medio de cultivo, con el cual se pretende realizar la fermentación que será monitoreada a fin de obtener los perfiles de concentración de biomasa, sustrato y producto.

2.6 BIOSÍNTESIS DE ÁCIDO LÁCTICO

El objetivo de esta etapa es el de determinar las curvas biocinéticas de consumo de sustrato, crecimiento de biomasa y síntesis de ácido láctico. Esta parte de la investigación se puede realizar únicamente después de tener los resultados obtenidos en la determinación del medio óptimo de fermentación (Sección 2.5).

La realización de esta etapa se desarrolló a nivel banco en un biorreactor Applikon de 3 L de capacidad y agitación controlada. En el Anexo G se dan las especificaciones del equipo.

De acuerdo con lo descrito en el numeral 2.4 se inició con la preparación de los medios de cultivo para inocular los microorganismos. Se preparó la proporción adecuada del caldo de adaptación (caldo MRS) que corresponde según las condiciones preestablecidas al 10% del volumen total de caldo de producción (150 mL de caldo) y se esterilizó en autoclave. Cuando el erlenmeyer estuvo a temperatura ambiente se inoculó con la cepa que tenía 48 horas de sembrada, y se dejó en incubadora por 48 horas a una temperatura de 39 - 43 °C.

Para la etapa de producción se emplearon 1,35 litros de medio líquido que incluía las concentraciones óptimas de nutrientes (extractos de levadura, malta y proteína), la fuente de nitrógeno (fosfato diamónico) y la fuente de carbono (jarabe de glucosa). De este líquido se tomó una muestra inicial para determinar la cantidad de azúcares reductores.

Simultáneamente a la esterilización del volumen de fermentación, se esterilizó el microfermentador (incluyendo todos sus accesorios, por 90 minutos, con vapor de caldera del Laboratorio de Plantas Piloto de la Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales). Luego de tener todo el equipo esterilizado, en condiciones asépticas se incorporó al microfermentador Applikon el líquido de fermentación previamente esterilizado.

Con el propósito de determinar la cantidad de biomasa inicial se tomó una muestra del inóculo antes de también ser adicionado al microfermentador en forma aséptica.

Se estabilizaron las condiciones de operación y se puso en marcha la fermentación. El proceso se inició con una velocidad de agitación de 150 rpm a fin de evitar la sedimentación del carbonato de calcio utilizado como agente neutralizante, para lograr un contacto permanente microorganismo – sustrato y para evitar gradientes de concentración del producto final. El pH de la fermentación así como la temperatura fueron monitoreados.

Se mantuvo una temperatura entre 37 y 43 °C durante los días de fermentación, y se tomaron muestras cada cuatro horas durante 3 días para determinar el perfil de concentración de biomasa, sustrato y producto.

En la Tabla 19 se presentan los parámetros determinantes en el proceso, la base utilizada, variables a determinar y de respuesta.

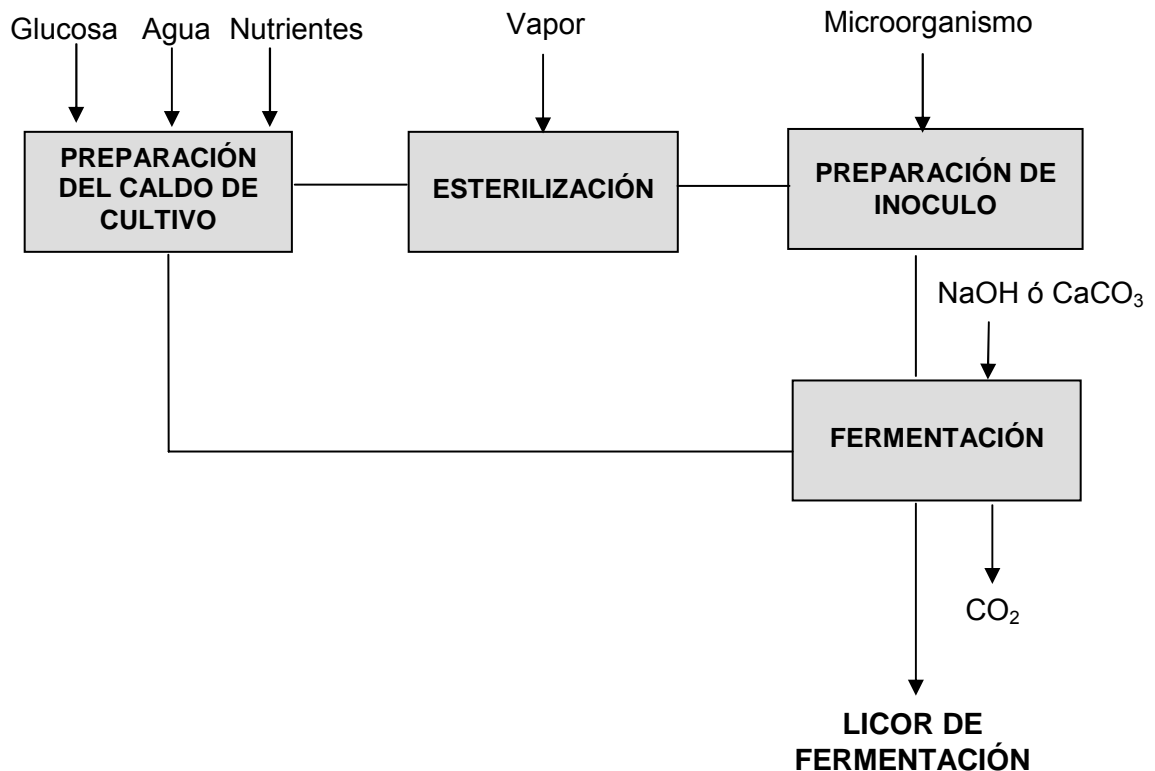
Tabla 19. Parámetros físico-químicos de control, variables a determinar y de respuesta *.

Tipo de variable	Valor	Unidades
VARIABLES FIJAS		
Volumen total	1,5	L
Temperatura	39 - 43	°C
Porcentaje de inóculo	10	%
Tiempo de fermentación	48	h
pH inicial	5 – 6	
Glucosa	15	% P/V
Fosfato diamónico	0,25	% P/V
Carbonato de calcio	10	%
Agua	74,73	%
VARIABLES A DETERMINAR		
Extracto de levadura		g/L
Extracto de malta		g/L
Extracto de proteína		g/L
VARIABLES DE RESPUESTA		
Concentración de ácido láctico		g/L
Concentración de glucosa		g/L
Concentración de biomasa		g/L

* El medio base utilizado es el descrito por Inskeep, Breitze y Taylor (1956)

La fermentación es anaerobia y por lo tanto la contaminación con aire o la respiración debe suprimirse, el CO₂ generado durante la fermentación ayuda a crear el ambiente anaerobio requerido. En la Figura 8 se muestra el diagrama de bloques para la producción de ácido láctico en la fermentación.

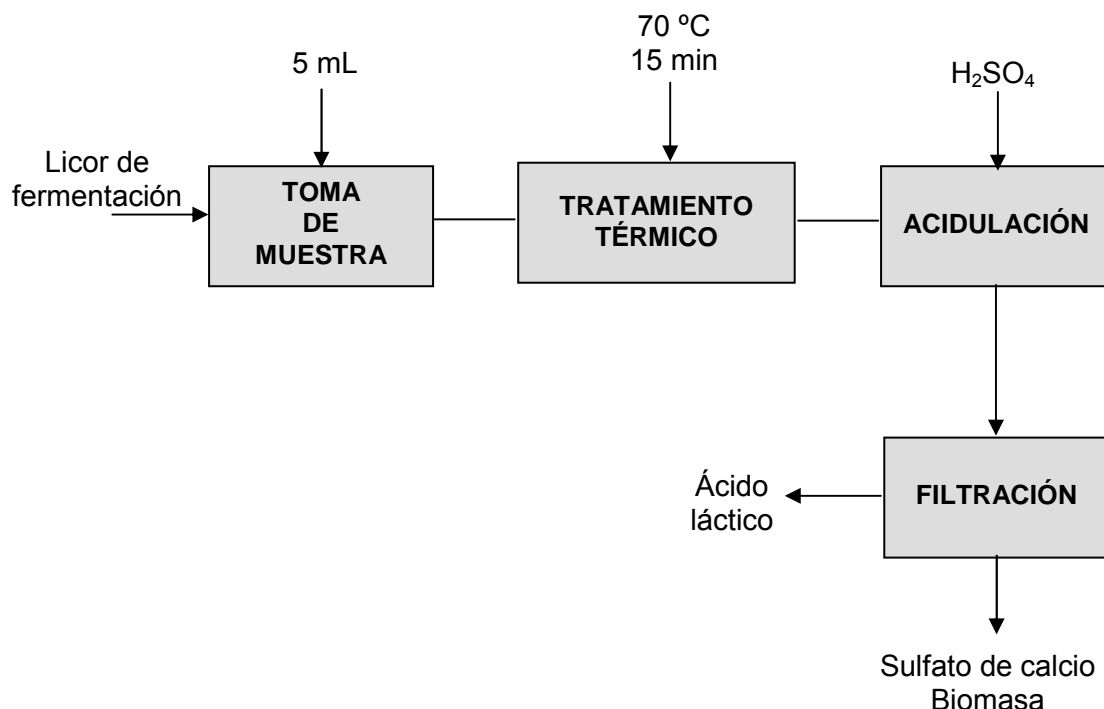
Figura 8. Diagrama de bloques para la producción de ácido láctico vía fermentativa.



2.6.1 Recuperación de ácido láctico. Las muestras se efectuaron empleando una pera como medio de succión que se colocaba en la pipeta de salida cada vez que se realizaba una toma para evitar que se contaminara. El volumen de muestra por toma fué de 5 mL, los cuales se dispusieron en un tubo de ensayo tapa rosca que se llevó a 70 °C a baño maría por 15 minutos y fue inmediatamente refrigerado para detener el crecimiento microbiológico. Finalmente, la muestra se acidificó con ácido sulfúrico, precipitando las sales (sulfato de calcio) y la biomasa las cuales se removieron por filtración.

En la Figura 9 se muestra el diagrama de bloques para la producción de ácido láctico y su recuperación.

Figura 9. Diagrama de bloques-Producción de ácido láctico-Recuperación.



2.6.2 Determinación de las curvas biocinéticas. Para la construcción de las curvas experimentales que establecen la biocinética de la fermentación del ácido láctico empleando jarabe de glucosa, se midió periódicamente el consumo de sustrato, crecimiento celular y producción de ácido láctico, realizando pruebas específicas para la determinación de estas variables durante el transcurso de la fermentación. Los datos obtenidos se utilizaron para determinar los parámetros de las ecuaciones que permiten modelar el proceso.

➤ **Concentración de sustrato (S).** Se refiere al consumo de azúcares reductores totales presentes en el jarabe de glucosa que se encuentra en el medio, ésta se determina por el método señalado en el Anexo A. Esta variable se mide en g/L.

➤ **Concentración de biomasa (X).** Es la cantidad de masa celular presente en el medio por unidad de volumen. Esta variable se mide en g/L, su determinación se realiza por el método descrito en el Anexo F.

➤ **Concentración de producto (P).** Con esta variable se obtiene la producción de ácido láctico en g/L. Su determinación se realizó con el método descrito en el Anexo B.

2.6.3 Modelamiento de la cinética de la fermentación. Para desarrollar el modelo biocinético se llevaron a cabo los siguientes pasos:

1. Planteamiento del modelo. Se escogieron las ecuaciones que de acuerdo a la literatura y a determinados criterios basados en su mayoría en el tipo de curva que presentó el crecimiento celular, modelaran con mayor precisión las curvas biocinéticas.

2. Determinación de parámetros. En esta parte se establecieron los parámetros de las ecuaciones escogidas anteriormente.

3. Solución del modelo. Luego de tener las ecuaciones con los parámetros definidos se procedió a solucionar el modelo numéricamente por el método de Runge-Kutta de segundo y tercer orden (herramienta utilizada “ode23” del paquete matemático Matlab ®).

4. Verificación del modelo. Una vez obtenidos los perfiles de las concentraciones de biomasa, sustrato y producto en función del tiempo proporcionados en la solución del modelo matemático, se compararon gráficamente con los puntos experimentales a fin de corroborar y dar validez al modelo planteado.

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.1.1 Caracterización del jarabe de glucosa. Con el propósito de corroborar las características del jarabe de glucosa que se utilizó en la fermentación, se siguieron los métodos enunciados en la Tabla 14 de la página 57, obteniendo los resultados presentados en la Tabla 20.

Tabla 20. Resultados de la caracterización del jarabe de glucosa comercial.

Parámetros	Resultado
Grados Brix (20 °C)	83,2
pH	5,1
Densidad	1,4134 g/mL
Azúcares Reductores (en 1,0 g de muestra)	0,4395 g

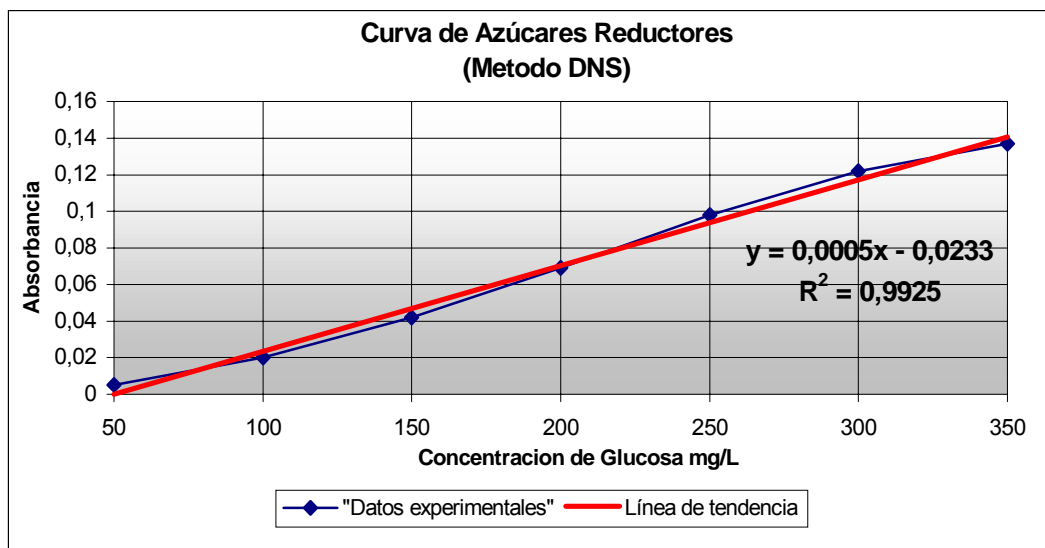
3.1.2 Preparación de la curva patrón de azúcares reductores. Esta curva se realizó preparando varios patrones de glucosa disueltos en agua destilada por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) detallado en el Anexo A. Las lecturas de absorbancia que se obtuvieron en el espectrofotómetro Perkin Elmer L20 se presentan en la Tabla 21.

Tabla 21. Datos para la obtención de la curva patrón de Azúcares reductores (DNS).

Longitud de Onda [nm]	Concentración [mg/L]	Absorbancia
540	50	0,005
540	100	0,02
540	150	0,042
540	200	0,069
540	250	0,098
540	300	0,122
540	350	0,137

La Figura 10 expone la relación lineal entre la concentración de glucosa y absorbancia con un coeficiente de correlación de 0,9925.

Figura 10. Curva patrón de azúcares reductores.

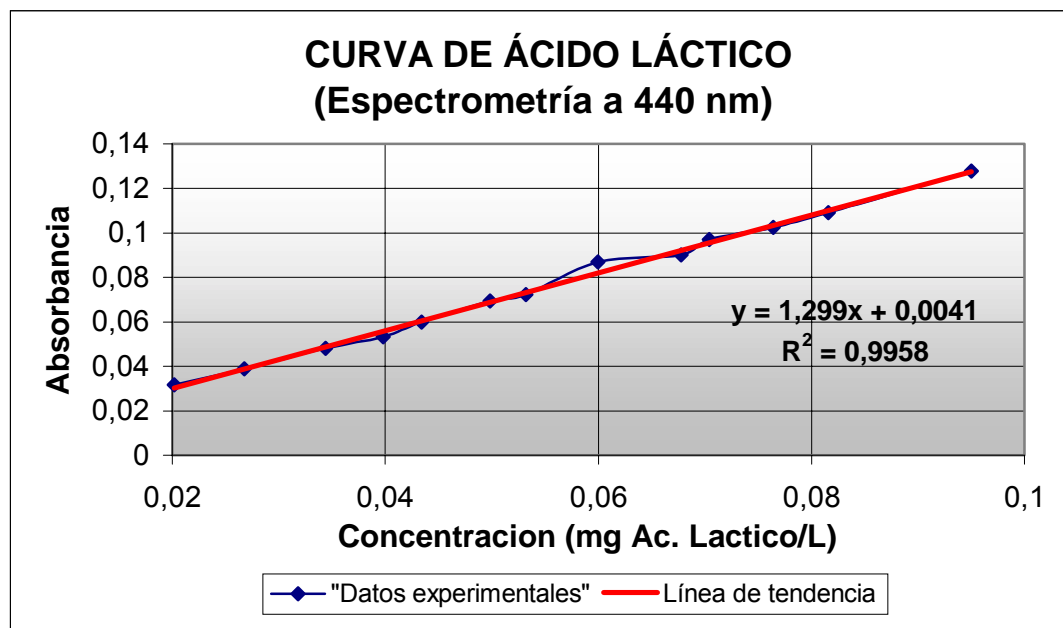


3.1.3 Curva patrón de ácido láctico. Esta curva se realizó preparando varios patrones de ácido láctico disueltos en agua destilada por el método colorimétrico del Cloruro Férrico (Anexo B). Los resultados se exponen en la Tabla 22 y Figura 11.

Tabla 22. Datos para la obtención de la curva patrón de Ácido Láctico.

Longitud de onda [nm]	Concentración [mg/L]	Absorbancia
440	0,0202	0,0317
440	0,0268	0,0390
440	0,0344	0,0480
440	0,0398	0,0533
440	0,0434	0,0598
440	0,0498	0,0695
440	0,0532	0,0722
440	0,0600	0,0869
440	0,0678	0,0901
440	0,0704	0,0970
440	0,0764	0,1026
440	0,0816	0,1091
440	0,0950	0,1278

Figura 11. Curva patrón de ácido láctico.



3.2 PREPARACIÓN DE LA CEPA

3.2.1 Selección del medio de activación de la cepa. Con la siembra de la cepa hidratada en agar MRS el crecimiento se demoró casi 3 días y se evidenció muy poco desarrollo bacteriano; mientras que con la siembra en caldo MRS la bacteria presentó buen crecimiento celular en un lapso de 24 a 48 h, corroborando las recomendaciones del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (Anexo C) donador de la cepa. Teniendo en cuenta lo anterior, se decidió que la activación de la cepa se realizaría utilizando el caldo MRS y como medida preventiva el crecimiento en agar se mantendría refrigerado (4 - 6 °C) como material de reserva en caso de pérdida de la cepa original.

3.2.2 Conservación de la cepa. La preservación de cepas productivas por largos periodos de tiempo, es un requerimiento básico para las fermentaciones prácticas. La simple sobrevivencia de las cepas no es el principal objetivo, los microorganismos pueden permanecer viables a través de transferencias

periódicas, pero su capacidad productiva es la que se debe preservar. Por tal razón se inocularon varias cajas de petri y tubos de medio líquido con la bacteria *Lactobacillus delbrueckii*, las cuales fueron conservadas de la forma descrita en el numeral 2.3.3.

3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EL MEJOR MEDIO DE CULTIVO

De acuerdo a la metodología reseñada en la sección 2.5 se definió el rango para las concentraciones de los nutrientes del medio de cultivo, así:

1. Extracto de levadura entre 0,1 - 10 g/L
2. Extracto de malta entre 0,1 - 10 g/L
3. Extracto de proteína entre 5 - 15 g/L

A partir de los rangos anteriores, la Tabla 23 cuantifica los niveles máximos y mínimos de las variables del sistema factorial que se presentaron en la Tabla 16.

Tabla 23. Cuantificación de los niveles máximos(+) y mínimos (–).

VARIABLE		CONVENCIÓN	NIVEL	
			BAJO (-)	ALTO (+)
Medio de cultivo	Extracto de levadura	A	0,1 g/L	10 g/L
	Extracto de malta	B	0,1 g/L	10 g/L
	Extracto de Proteína	C	5 g/L	15 g/L

La matriz que sustituye la combinación de tratamientos indicados en la Tabla 17 que determina las concentraciones de los nutrientes de los diferentes medios de cultivo, es relacionada en la Tabla 24.

Tabla 24. Matriz de combinación de tratamientos para el plan de diseño factorial 2³.

Corrida	A	B	C	Combinación del tratamiento
1	0,1	0,1	5	(1)
2	10	0,1	5	a
3	0,1	10	5	b
4	10	10	5	ab
5	0,1	0,1	15	c
6	10	0,1	15	ac
7	0,1	10	15	bc
8	10	10	15	abc

Esta matriz indica cómo se combinan los niveles de las variables dentro de cada experiencia. Así en la corrida número 1 se trabajó con las variables A, B, C, en el nivel inferior, esto quiere decir que la variable A (Extracto de levadura) toma el valor de 0,1 g/L, la variable B (Extracto de malta) toma el valor de 0,1 g/L y la variable C (Extracto de proteína) toma el valor de 5 g/L.

Con las combinaciones de los tratamientos descritos en la Tabla 24, se obtuvieron los valores para el rendimiento en ácido láctico y en consumo de jarabe de glucosa para cada uno de los medios y por duplicado. En la Tabla 25 se proporcionan los resultados obtenidos.

Tabla 25. Respuestas obtenidas del diseño factorial (pruebas por duplicado).

Experiencia		Jarabe de glucosa [g/L]		Ácido láctico [g/L]	
		Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2
1	(1)	108,123	113,903	18,356	17,610
2	a	112,052	142,678	18,367	17,793
3	b	126,487	122,255	17,446	18,263
4	ab	121,319	107,993	17,626	18,334
5	c	108,782	109,898	16,065	16,420
6	ac	125,431	123,857	17,649	18,111
7	bc	115,236	129,394	17,339	18,751
8	abc	117,562	110,062	18,062	18,142

De la tabla anterior se calculan los parámetros I, A, B, AB, C, AC, BC y ABC, los cuales de acuerdo a Montgomery [24] permiten maximizar las variables y obtener los valores óptimos. Los valores de estos parámetros se presentan en la Tabla 26.

Tabla 26. Parámetros estadísticos para ácido láctico.

	Valor	Desviación Respecto a I (%)	Desviación típica (S)	Conclusión
I	35,542	0	78,952	
A	0,4790	1,3476	0,9177	(+) 10 g/L de extracto levadura
B	0,4490	1,2632	0,8063	(+) 10 g/L de extracto de malta
AB	- 0,3880	- 1,0916	0,6021	
C	- 0,4072	- 1,1458	0,6633	(-) 5 g/L de extracto de proteína
AC	0,3682	1,0360	0,5424	
BC	0,5632	1,5847	1,2689	
ABC	- 0,4022	- 1,1317	0,6471	

En la tabla anterior I representa el promedio de la suma de los valores para ambas réplicas reportados en la Tabla 25 de ácido láctico. Debido a que el valor de A (extracto de levadura) es positivo, el valor de B (extracto de malta) es positivo y el valor de C (extracto de proteína) es negativo, los niveles correspondientes para cada uno de las convenciones es alto (+), alto(+) y bajo(-) respectivamente, lo que nos indica que se favorece la combinación correspondiente a la corrida número cuatro (4).

Igualmente los datos de la cuarta columna indican una desviación poco significativa entre los datos reportados, es decir, la homogeneidad de los mismos hace que sus fluctuaciones no sean representativas para el diseño. El valor negativo de ABC demuestra que no se presenta interacción entre los factores.

La Tabla 27 presenta los valores I, A, B, AB, C, AC, BC y ABC que permiten analizar el efecto del consumo de jarabe de glucosa en las diferentes

composiciones de los medios cultivo. Los datos allí utilizados son los que se reportaron en la Tabla 25 para ambas réplicas de jarabe de glucosa.

Tabla 27. Parámetros estadísticos para jarabe de glucosa.

Parámetro	Valor	Desviación Respecto a I (%)	Desviación típica (S)	Conclusión
I	236.878	0	876,737	
A	3,3603	1,4	45,1651	(+) 10 g/L de extracto levadura
B	0,6972	0,294	1,9446	(+) 10 g/L de extracto de malta
AB	-12,4692	-5,2639	13,3116	
C	-1,8243	-0,770	62,1928	(-) 5 g/L de extracto de proteína
AC	0,0403	0,0170	0,0065	
BC	0,3742	0,1579	0,5603	
ABC	0,5657	0,2388	1,2803	

En la Tabla 27 se observa que los valores para las convenciones A, B y C corresponden a los niveles alto (+), alto(+) y bajo(-) respectivamente.

Nuevamente se favorece la combinación de tratamientos correspondiente a la corrida número cuatro (Tabla 28), pese a que en éste caso la desviación entre los datos es significativa, es decir, no hay homogeneidad entre los valores analizados. Las interacciones entre los factores también tienen relevancia para el diseño, sin embargo, debido a sus valores tan bajos en comparación con cada una de las convenciones, pueden despreciarse sus efectos.

De los resultados obtenidos en el análisis de las Tablas 26 y 27 se concluye que la combinación de tratamientos que mejor favorece la producción de ácido láctico y al mismo tiempo el consumo de jarabe de glucosa es la correspondiente a la corrida número cuatro (4). Así, la concentración de los nutrientes que se deben

suministrar al caldo de cultivo para la fermentación que se monitoreará, queda completamente especificada.

A partir de los valores fijados, se puede cuantificar la Tabla 15 que define los parámetros involucrados en el diseño experimental, tal como se muestra en la Tabla 28.

Tabla 28. Cuantificación de los factores del diseño experimental.

PARÁMETRO		TIPO	RANGO	Ref.
Temperatura	Inoculación	Constante	43 °C	Anexo C
	Fermentación	Constante	39- 43 °C	[5]
PH		Constante	5,3	[5]
Tiempo	Inoculación	Constante	48 h	Anexo C
	Fermentación	Constante	48 h	[5]
Medio de Cultivo	Extracto de Levadura	Variable	10 g/L	[39]
	Extracto de Malta	Variable	10 g/L	[39]
	Extracto de Proteína	Variable	5 g/L	[39]
Concentración de Sustrato inicial		Constante	15 % P/V	[5]

3.4 BIOSÍNTESIS DEL ÁCIDO LÁCTICO

3.4.1 Determinación de las curvas biocinéticas. Siguiendo la metodología descrita en la sección 2.6 se obtuvieron los datos listados en la Tabla 29, los cuales describen los perfiles de comportamiento del crecimiento celular, el agotamiento del sustrato (jarabe de glucosa) y la aparición de producto (ácido láctico) en función del tiempo de fermentación.

Los puntos que no aparecen en la tabla corresponden a muestras que no pudieron ser evaluadas adecuadamente.

Tabla 29. Datos experimentales del desarrollo de la fermentación.

Tiempo [h]	Biomasa [g/L]	Sustrato [g/L]	Producto [g/L]
0	0,4392	150,0000	0,0000
4	0,4720	145,7143	0,0218
8	0,5210	141,8231	0,4341
12	-----	140,6853	0,8982
16	0,9120	136,9096	0,9146
20	1,6800	132,9362	0,9969
24	1,2464	130,7457	5,7256
28	2,0000	130,3178	9,4570
32	2,8000	127,6315	15,7890
36	3,9300	124,6645	25,1460
40	-----	121,3952	32,4578
44	4,8340	117,8013	41,4581
48	5,3420	115,8627	48,7986
52		115,5599	49,6956
56	6,3123	110,8786	50,1326
60	6,3521	108,8073	53,2895
64	6,4000	104,3435	54,1263
68	6,5320	98,4919	59,1235
72	-----	84,2711	59,2943

3.4.2 Modelamiento de la cinética de la fermentación. Para desarrollar el modelo biocinético se llevaron a cabo los siguientes pasos:

1. Planteamiento del modelo. El sistema de ecuaciones diferenciales que se utilizó para la simulación del proceso fermentativo, es un sistema acoplado que involucra la ecuación logística para el crecimiento celular, con el consumo de sustrato y la aparición de producto. El “set” de ecuaciones es presentado en la Tabla 30.

Tabla 30. Sistema de ecuaciones para la simulación del proceso.

Variables de respuesta del modelo	Ecuación	Numeral
Crecimiento celular	$r_x = kX(1 - \beta X)$	(1.7)
Consumo de sustrato	$r_s = -\frac{1}{Y_{X/S}} \frac{dX}{dt} + m_s X$	(1.11)
Aparición de producto	$r_p = Y_{P/S} \frac{dS}{dt}$	(1.15)

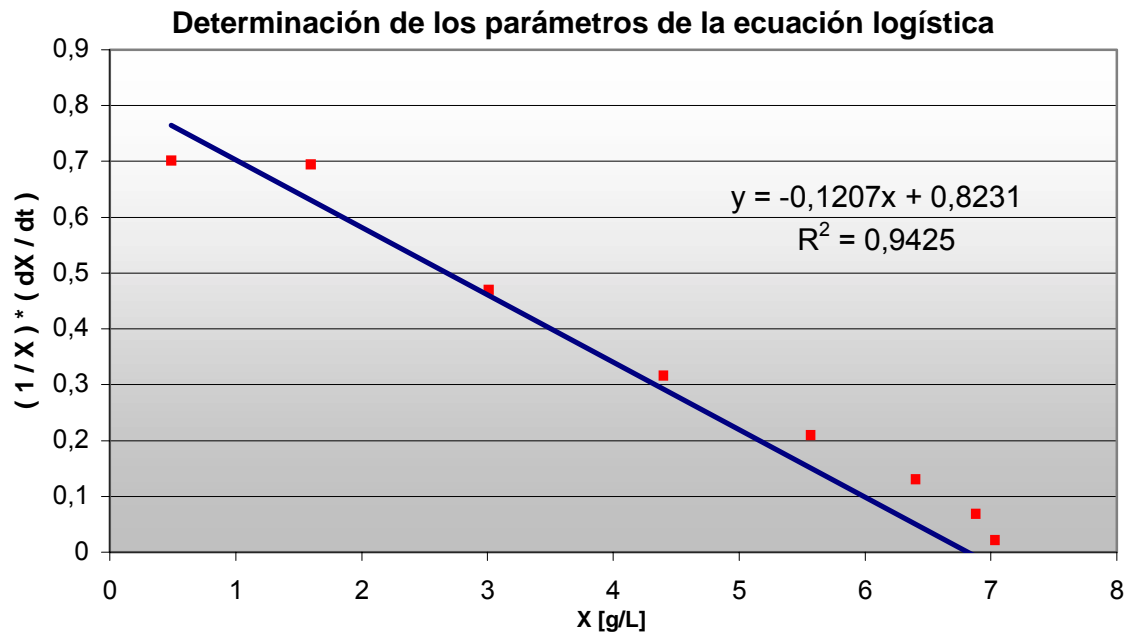
2. Determinación de los parámetros cinéticos. Con base en los resultados de la Tabla 29, se determinaron las constantes $Y_{X/S}$, $Y_{P/S}$, β , k , m_s (Tabla 31).

Tabla 31. Parámetros cinéticos del sistema de ecuaciones.

	Valor	Unidades	Cálculos
$Y_{X/S}$	0,0927	[g biomasa / g sustrato]	Ecuación (1.13)
$Y_{P/S}$	0,9021	[g producto / g sustrato]	Ecuación (1.16)
β	- 0,1207	[g biomasa ⁻¹]	Regresión lineal Ecuación (1.7) (Figura 12)
k	0,8231	[h ⁻¹]	
m_s	0,14	[g sustrato/(g biomasa.h)]	Referencia bibliográfica [7]

Para hallar el valor de los coeficientes k y β de la ecuación logística se empleó el procedimiento utilizado por Klasson *et. al.* [19], k y β se toman como el término independiente y la pendiente respectivamente de la línea recta resultante de la linearización de la ecuación (1.7); para obtener los valores de esta recta fue necesario hallar los incrementos de biomasa (dX) a un incremento de tiempo constante (dt) utilizando la curva ajustada de los datos experimentales de biomasa (X) y el programa Excel. La recta obtenida al graficar $(1/X)$ (dX/dt) Vs. X es mostrada en la Figura 12.

Figura 12. Parámetros cinéticos de la ecuación logística.

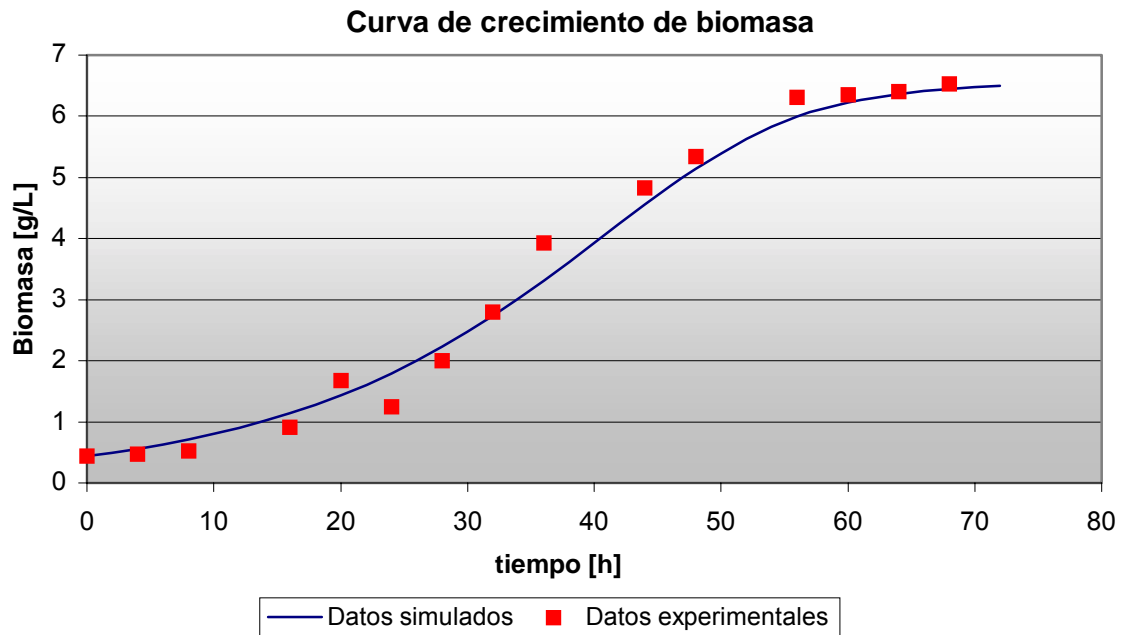


3. Solución y verificación del modelo. De acuerdo a la metodología señalada en la sección 2.6.2, la solución numérica del modelo matemático se grafica en la Figura 13 para la ecuación (1.7) del crecimiento microbial, en la Figura 14 para la ecuación (1.11) de consumo de sustrato y en la Figura 15 para la ecuación (1.15) de aparición de producto. Todas las curvas simuladas son cotejadas con los puntos experimentales de la Tabla 29.

➤ **Crecimiento microbial.** Para la simulación del crecimiento celular se escogió la ecuación logística que reproduce con mayor precisión el desarrollo microbial tanto en la fase exponencial como en la estacionaria.

De la Figura 13 se pueden distinguir con facilidad tres fases del crecimiento celular: una etapa de adaptación del microorganismo al medio, en donde su concentración permanece prácticamente igual a la del momento de la inoculación ($X_0 = 0,4392$ g/L), con un tiempo de duración entre 0 y 12 horas aproximadamente.

Figura 13. Perfil del crecimiento de biomasa en función del tiempo.



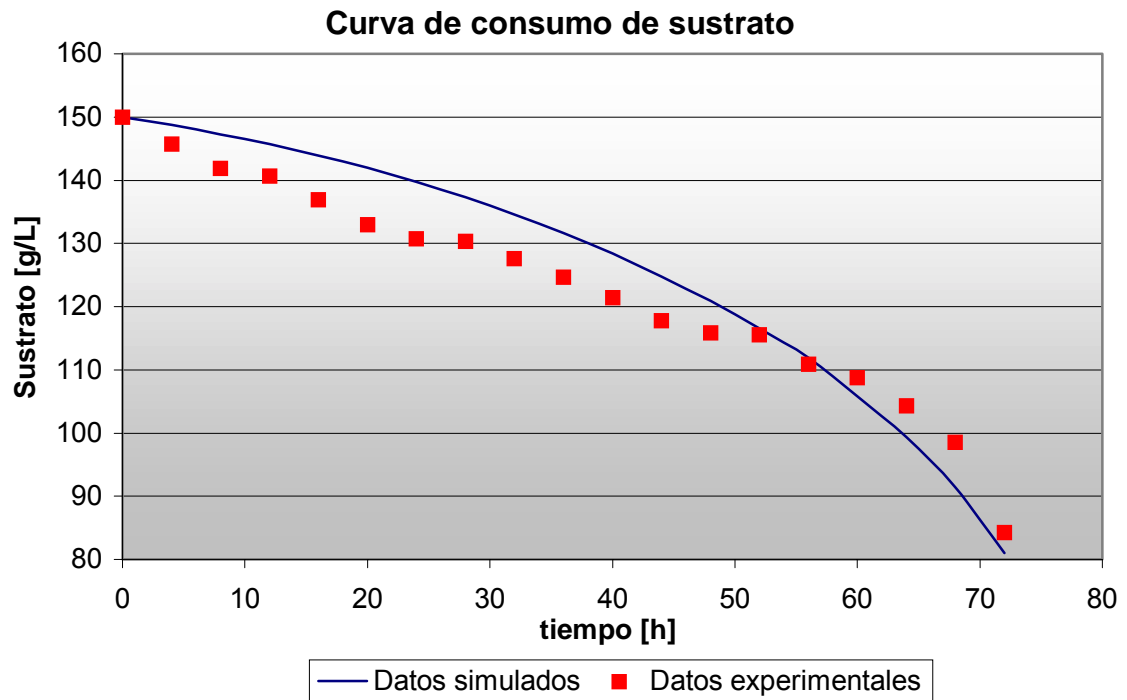
Entre 12 y 60 horas aproximadamente se presenta la segunda etapa que corresponde a una fase exponencial “alargada”. Después de esta fase aparece la fase estacionaria, en donde no se identifica un aumento significativo en la densidad celular.

La dilatación de la fase exponencial, justifica razonablemente el tiempo teórico requerido para la fermentación ácido láctica, el cual es relativamente superior al requerido en otro tipo de fermentaciones (alcohólicas).

➤ **Consumo de sustrato.** En la Figura 14 esquematiza el agotamiento sucesivo de la fuente de carbono durante el transcurso de la fermentación.

El lánguido deceso del sustrato da buena fe de la fase exponencial “alargada” que presentó el microorganismo en la Figura 13. Pese a esto su caída más vertiginosa se presenta justo en la etapa estacionaria del microorganismo.

Figura 14. Perfil del consumo de sustrato en función del tiempo.

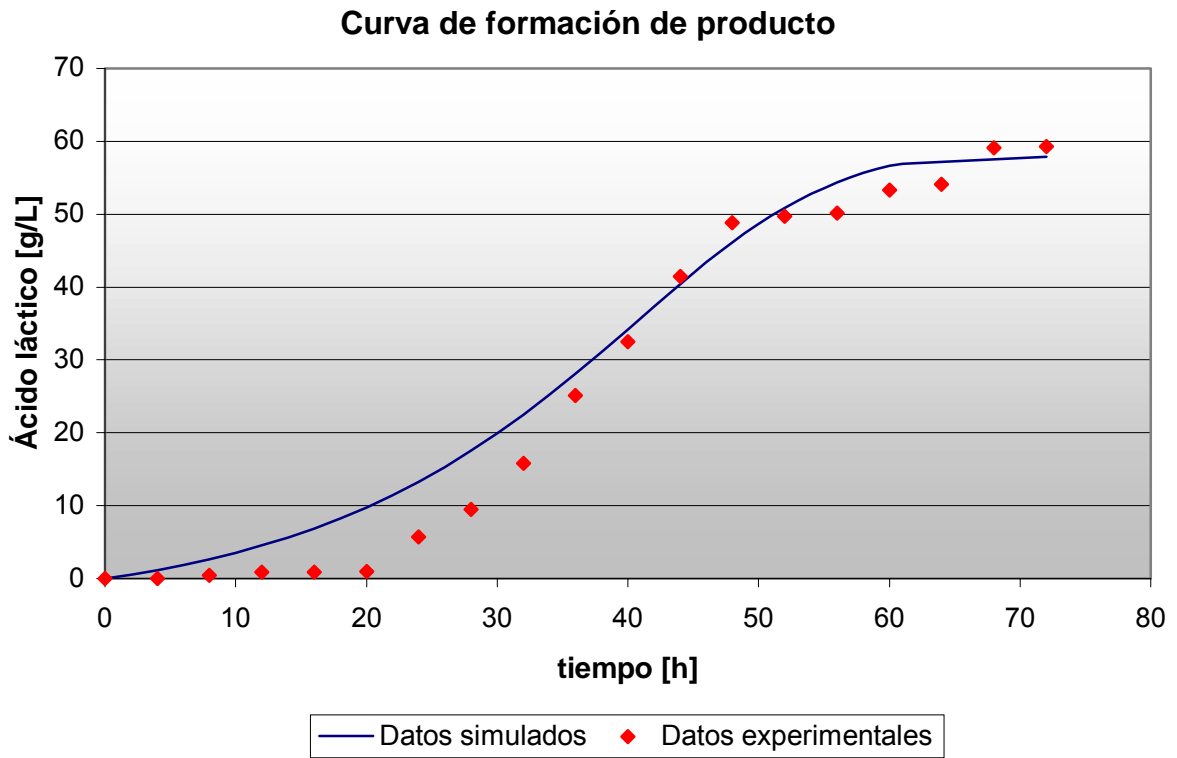


Como se evidencia en la Figura 14 el consumo de sustrato en el tiempo final de fermentación no ha alcanzado ni el 50 % de su valor inicial (glucosa 15 % P/V).

➤ **Aparición del producto.** La Figura 15 reproduce la formación de ácido láctico durante el proceso fermentativo. Si bien su perfil de comportamiento es muy similar al de crecimiento celular, presenta una fase de desarrollo más vigorosa y tiende a estabilizarse en un tiempo menor que éste último.

Según los datos experimentales durante las primeras 20 horas de fermentación no se verifica un aumento significativo en la producción de ácido láctico, tiempo que aproximadamente tarda el microorganismo en emprender su desarrollo exponencial. Adicionalmente en este mismo tiempo el consumo de sustrato no se altera en forma considerable.

Figura 15. Perfil de la aparición de producto en función del tiempo.



En las figuras 13, 14 y 15, la nube de puntos experimental se distribuye con la misma tendencia o perfil de comportamiento otorgado por la simulación para cada una de las variables de respuesta del sistema.

El modelo cinético planteado para la fermentación y obtención de ácido láctico se ajusto adecuadamente a los datos experimentales, obteniéndose un rendimiento de 90.21 %, expresado como gramos de ac.láctico producido / gramos de sustrato consumido.

Demostrandose así que por ejemplo con el estudio de Pan, Peterson y Jhonson, 1940, que es posible obtener un rendimiento real muy similar o mas alto utilizando glucosa como sustrato (90.21 %) complementada con malta (87.3%).

En la tabla siguiente se resumen los diferentes reportes de producción de ácido láctico teniendo en cuenta los resultados del presente estudio por diferentes microorganismos y sustratos.

Tatum y Peterson (1935)	Streptococcus Lactis Lactobacillus casei L. delbrueckii	glucosa	94.0 93.0 95.0
Peterson, Pan y Johnson (1940)	L. delbrueckii	melaza	87.3
Cordon et al (1950)	Lactobacillus** L. pentosus 124-2 L. delbrueckii NRLB-445	Almidón de papa	61.9 91.2 79.4
Campbell (1953)	L. bulgaricus (ATCC9224)	Lactosa	85 – 95
Rhone Poulenc S.A 1971	L. kleicmannii	-----	77.0
Jun Luo et al (1997)	SSLF L. delbrium	Glucosa a partir de celulosa	79 Basado en consumo
Grupo Bioprocesos I.Q. de U.A.	L. plantarum L. casei	Lactosa	48-50
S Korohodou (2000)	-----	Glucosa	89
Burgos (2000)	L. Bulgaricus (NRRL B-548)	Lactosa Glucosa Galactosa	90
Orozco Patricia y Solarte Juan (2003)	L. delbrueckii (NRRL B-763)	Glucosa	90.21

4. CONCLUSIONES

- ❖ En esta etapa inicial se pudo comprobar que el Caldo MRS de (Man Rogosa Sharpe) es un medio que ofrece los nutrientes necesarios para la activación y crecimiento del *Lactobacillus Delbrueckii*. De igual manera se pudo evidenciar que las condiciones a las que mejor se desarrolla es a una temperatura de 43 °C respectivamente, en un tiempo de 48 horas.
- ❖ De acuerdo con los resultados obtenidos en la experimentación, se concluye que los parámetros más adecuados para la producción de ácido láctico a partir de jarabe de glucosa y utilizando el *Lactobacillus Delbrueckii* son Temperatura de 43 °C y un pH de 5,3.
- ❖ El parámetro que más afecta la producción de ácido láctico es el pH, por lo tanto es necesario mantenerlo constante y así garantizar una buena producción y alcanzar estabilidad en un tiempo más corto.
- ❖ De los resultados obtenidos en el análisis estadístico para la obtención del mejor medio de cultivo se concluye que la combinación de tratamientos que mejor favorece la producción de ácido láctico y al mismo tiempo el consumo de jarabe de glucosa corresponde a las siguientes composiciones 10 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de extracto de malta y 5 g/L de extracto de proteína.
- ❖ El modelo cinético planteado para la fermentación y obtención de ácido láctico se ajusta adecuadamente a los datos experimentales, aunque no se descarta que con un mayor número de datos, el empleo de modelos cinéticos más complejos y un estudio detallado de las vías metabólicas se pueda lograr un ajuste mayor.

- ❖ Se obtuvo un rendimiento 90.21 %, expresado como gramos de ac.láctico producido / gramos de sustrato consumido.
- ❖ Los valores de rendimiento fueron similares y en algunos casos superiores a los de otros estudios realizados

5. RECOMENDACIONES

- ❖ Realizar un mejoramiento en las condiciones de control en las mediciones de pH y biomasa, así como en el manejo el microorganismo, ya que son parámetros fundamentales en el desarrollo de la fermentación.
- ❖ Empleando los resultados de la simulación, es posible realizar un escalado del proceso de fermentacion estudiado (en un volumen e 1.5 L), a nivel de planta piloto con miras a su implementacion industrial.
- ❖ El mayor número de datos podría mejorar el ajuste del modelo, aumentando su complejidad, pero también su representatividad de los procesos metabólicos.
- ❖ Valdría la pena evaluar el incremento en productividad que se podría obtener al realizar la fermentación continua, metodología ventajosa ya que permite eliminar continuamente el ácido producido, el cual al estar libre en el medio es tóxico para los microorganismos.
- ❖ Igualmente, se debe tener en cuenta la inmovilización de células, proceso que ha mostrado ser mucho más productivo que la fermentación por lotes, pero en el cual el control de proceso es mucho más riguroso.
- ❖ Hacer el seguimiento del crecimiento microbiano en forma cuantitativa por un método confiable y rápido por la importancia que tiene estos en el proceso de fermentación.
- ❖ Evaluar con otro tipo de sustratos obtenidos a partir de especies locales, u otro tipo de procedimientos similares que permitan comparar su rendimiento.

BIBLIOGRAFÍA

1. APPLIKON., Dependable Instruments. User Manual Autoclave Biorreactor 3 Liter. Noviembre 1991.
2. ATKINSON B. Reactores Bioquímicos, Barcelona: Reverté, S.A., 1986. p. 7 - 8, 15 - 21.
3. AUSTIN, George T. Manual de Procesos Químicos en la Industria. 5a. Edición. McGRAW- HILL, 1988. Tomo III. p 663-674.
4. BAILEY, James and OLLIS, David. Biochemical Engineering Fundamentals. Segunda Edición. McGraw Hill, 1986.
5. BLANCH, Harvey and DOUGLAS, Clark. Biochemical Engineering. Editorial Marcel Dekker, 1997.
6. BROCK Thomas; MICHAEL T; JOHN M and JACK P., Biology of Microorganisms, 7th edition. Prentice Hall. p 367-368,794-799.
7. BURGOS-RUBIO, Concepción N.; OKOS, Martín R.; WANKAT, Phillip C. "Kinetic study of the Conversion of Different Substrates to Lactic Acid Using *Lactobacillus bulgaricus*". Biotechnol. Prog. 2000, 16, p 305 – 314.
8. CAMBPBELL, L.A. Production of calcium lactate and lactic acid from cheese whey. Can. Dairy ice cream Jour. 32, 3 (1953); p. 29-31.
9. CORDON, T.C. et al. Lactic acid from potatoes. Ind. Eng. Chem. 42, 1950, p. 1833 –1836.

10. <distans.livstek.lth.se:2080/L_bulg.htm>
11. DORAN, Pauline M. Principios de ingeniería de los bioprocesos. Editorial Acribia, S.A., 1998.
12. DUARTE T., Alberto. Introducción a la Ingeniería Bioquímica. Publicación Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, 1995.
13. Enciclopedia Salvat. Ciencia y tecnología. Tomo I. p. 101-103
14. Enciclopedia Salvat. Ciencia y tecnología. Tomo VIII. p. 593-594
15. GUZMÁN, M. Rosmery y HERNANDEZ, A. Martha Lucia. Fermentación anaerobia del suero láctico desproteinizado. Medellín, 1990. Trabajo de grado. Universidad Nacional de Colombia.
16. HENSIRISAK, Patcharee. "Scale up the use of a microbubble dispersión to increase oxygen transfer in aeróbic fermentation of Baker`s yeast". Tesis instituto Politécnico de Virginia. Estaos Unidos, 1997.
17. JAGNOCO G y DAWID W. Biotecnología, Introducción con experimentos modelo. Zaragoza: Acribia S.A.
18. KAFAROV, V. V; A Yu & VINAROV, GORDEEV, L.S. Modelirovanie Biojicheskij Reactorov. Moscu : Lesnaya promyshlennost`, 1979.329 p.
19. KLASSON, T. GLAUSEN, E. GADDY, J. "Continuous fermentation for the production of acid citric from glucose". Appl. biochem. Biotechnol. Vol. 20, No. 21, 1984.

20. LIMA, U. A; AQUARONE, E. y BORZANI, W. Biotecnología: Tecnología de las fermentaciones. Sao Paulo: Edgard Blucher Ltda., 1975. V.
21. LUO, Jun. et al. "Kinetics of simultaneous saccharification and lactic acid fermentation processes". Biotechnol. Prog. 1997, 13, p 762 – 767.
22. Manual de Técnicas de Laboratorio Universidad Católica.
23. Merck. Manual de medios de cultivo, 1996.
24. MONTGOMERY, D. Diseño y análisis de experimentos. Grupo editorial iberoamericana 1991.
25. MONTOYA G., Didier A. Y BERMÚDEZ S., Mónica Y. Modelamiento de la transferencia de oxígeno para el cultivo de microorganismos en un biorreactor de columna de burbujeo. Universidad Nacional de Colombia. Manizales 2003.
26. MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of Reducing Sugars, Analytic chemistry 31, 1959. Pag 426-8.
27. OWEN P., Ward. Biotecnología de la fermentación. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, 1991.
28. PAN, S.C; PETERSON, W.H. y JOHNSON, M.J. Acceleration of lactic acid fermentation by heat - labile substances. Ind. Eng. Chem. 32, 1940; p. 709-714.
29. PEÑUELA, Mariana; Gabriel, VARGAS; Ana M. TORRES; Rigoberto RÍOS. "Evaluación e medios de cultivo preparados a partir de suero de leche enriquecido, para la producción de ácido láctico, con *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus casei*". Revista Facultad de Ingeniería. No. 24, p 35 – 39, 2001.

30. PERRY, R. *et al.* Manual del Ingeniero Químico. Sexta edición en español. Volumen 6, McGraw Hill, México, 1992.
31. QUINTERO R., Rodolfo. Ambientes computacionales para el diseño, optimización e innovación en procesos biotecnológicos, 1997.
32. REID, R.C.; PRAUTNIZ, J.M. and SHERWOOD, T.K. The properties of gases and liquids. McGraw-Hill. New York, 1997.
33. SÁNCHEZ G., Valentina; AGUDELO M., María A. Obtención de ácido itacónico por fermentación con *Aspergillus Terreus*. Universidad Nacional de Colombia. Manizales, 1999.
34. SKOROHODOV A. Modelling and Stability Researching of Lactic Acid Production Process in Membrane Biorreactor. e-mail: chemcom@muctr.edu.ru.
35. SONNLEITHER, B. and K(PELLI, O. "Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by its limited respiratory capacity: formulation and verification of a hypothesis". Biotechnology and bioengineering. Vol. XXVIII, p 927 – 937. Jhon Wiley & Sons Inc. 1986.
36. STENROOS, S.L; LINKO, Y; y linko, p. Production of L – lactic acid with immobilized *Lactobacillus delbrueckii*. Biotechnol Lett. 4, (1982); p. 159.
37. SURIDERP, Chahal. ULLMAN'S Encyclopedia of industrial chemistry: ácido láctico. 5 edition. De Barbara Elvers editors. A15, (1995); p 97-104.
38. TATUM, E. L.; PETERSON, W.H. Fermentation method for production of dextrolactic acid. Ind. Eng. Chem. 27, (1935); p. 1493.

39. TÉCNICAS PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE FORMULACIONES DE HONGOS ENTOMOPATOGENOS. Federación Nacional De Cafeteros de Colombia. CENICAFE. Boletín Técnico Nr° 17. 1997.
40. TÉLLEZ, Luis; MOLDES, A. B; VÁZQUEZ , M y ALONSO J.L. Departamento de Ciencia y tecnología de los alimentos, Universidad Autónoma de Tamaulipas <http://ift.confex.com/ift/2002/techprogram/paper_11883.htm> .
41. URMENETA, B. Alonso, *et al.* Manual práctico de microbiología. Masson, S.A., Barcelona – España, 1995, p 5 – 9.
42. VOGEL, Henry and TODARO, Celeste. Fermentation and Biochemical Engineering Handbook. Principles, process desing, and equipment. Second edition. Noyes Publications. New Jersey,

Anexo A

Método del DNS para determinación de azúcares reductores

El ácido dinitrosalicílico, es un reactivo desarrollado por Sumner y se utiliza para la determinación de azúcares reductores, está compuesto de ácido dinitrosalicílico, tartrato de sodio y potasio, fenol, bisulfito de sodio e hidróxido de sodio.

El tartrato de sodio y potasio es introducido para prevenir que el reactivo disuelva oxígeno, el fenol incrementa el color producido; el bisulfito estabiliza el color obtenido en presencia del fenol. La alcalinidad es requerida para producir la reducción de la glucosa y de esta forma tener un mayor efecto del ácido dinitrosalicílico.

La química en la prueba del DNS, es la reducción que sufre este por la glucosa; el ácido 3,5 dinitrosalicílico es reducido al compuesto 3-amino-5-nitrosalicílico a causa del grupo aldehído que se oxida a su vez a grupo carboxilo.

Preparación del reactivo:

- ❖ Solución A: Hidróxido de sodio 13,5 g en 300 mL de agua destilada
- ❖ Solución B: Se disuelven 8,8 g de DNS, con 32,5 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado en 800 mL de agua destilada.
- ❖ Solución C: Mezcla de las soluciones A y B
- ❖ Solución D: Se pesa 2,2 g de NaOH, con 10 mg de fenol en cristales en 100 mL de agua destilada.

- ❖ Solución de bisulfito de sodio: Se disuelve 5 g de NaHSO_3 en 25 mL de agua destilada.
- ❖ El reactivo DNS es preparado adicionando a la solución C 69 mL de la solución D y 23,2 mL de solución de bisulfito de sodio

Preparación de la curva³:

Se prepara una curva patrón de glucosa entre 0 y 250 mg/mL. Por ejemplo para el primer patrón se toman 0.5 mL de la solución de glucosa y se adiciona 1.5 mL de reactivo DNS y se lleva a un baño en ebullición por 5 minutos para que genere la reacción de color, inmediatamente después la muestra se lleva a un baño de agua hielo por otros 5 minutos. Después se adicionan 9.5 mL de agua deionizada y 0.5 mL; se espera 30 minutos con el fin de que haya estabilización de la reacción.

Una vez transcurrido este tiempo, se lleva a la lectura del espectrofotómetro a 540 nm.

³ Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, Gail Miller Analytical Chemistry Vol 31 No 3 Marzo de 1959.

Anexo B

Método de cloruro férrico para la determinación de ácido láctico

La cuantificación de ácido láctico se puede realizar por diferentes métodos. En el trabajo se utilizó el siguiente método colorimétrico: se toman 10 mL de muestra a la que se le adicionan 5 mL de solución de FeCl_3 y se completa a 50 mL con agua destilada. Se prepara un blanco con agua para calibrar el equipo y se lee la absorbancia de la muestra a $\lambda=440$ nm [15].

El cloruro férrico (FeCl_3) se prepara pesando 0,5 g de FeCl_3 , adicionando 1 mL de HCl 0,1 N y completando a 50 mL con agua destilada.

La lectura debe ser inmediata debido a que este reactivo se descompone rápidamente con la luz.

Tabla B1. Datos para la obtención de la curva patrón de ácido láctico *.

Longitud de Onda (nm)	Concentración [g/L]	Absorbancia
440	0,0202	0,0317
440	0,0268	0,0390
440	0,0344	0,0480
440	0,0398	0,0533
440	0,0498	0,0598
440	0,0532	0,0695
440	0,0600	0,0722
440	0,0678	0,0869
440	0,0704	0,0901
440	0,0764	0,0970
440	0,0816	0,1026
440	0,0950	0,1278

* Ácido láctico producido por laboratorios "Galactic".

Anexo C

Distribución de los cultivos puros

Para conseguir el cultivo de los microorganismos puros, se acude a casas especializadas, laboratorios donde la mayoría de las veces recomiendan los medios y la forma de lograr un buen cultivo y mantenimiento.

A continuación se referencia el contacto que suministró la cepa de *Lactobacillus delbrueckii*:

Microbial Propierties Research.
United States Department of Agriculture.
Agricultural Research Service Midwest Area.
National Center for Agricultural Utilization Research.
1815 North University Street.
Peoria, Illinois 61604 - 3999 U.S.A.
Telephone 309-681-6560
Email: mplkn@sunca.nacaur.gov
Dr. L. K. Nakamura, Microbiologist Emeritus

Recomendaciones:

Caldo óptimo de inoculación : caldo MRS de (Man Rogosa Sharpe).

Temperatura óptima de incubación: 43 °C.

Tiempo de incubación 24 - 48 h

Anexo D

Manejo de las muestras y toma del inóculo

Materiales:

Cajas de petri, tubos de ensayo tapa rosca, pipetas se 1 mL estériles, material e vidrio estéril, algodón, agua destilada estéril, medios semisólidos y caldos de cultivo, autoclave, mecheros (gas preferiblemente), incubadora, microscopio, laminas, laminillas, asa, y cepa.

La toma del inóculo (de una muestra que hay que examinar, de un medio sólido, de un tubo con liquido, etc) es simple, pero requiere alguna atención. Se recomienda [41].

Procedimiento:

1. Coloque frente a usted el mechero y la preparación o muestra que contiene los microorganismos.
2. Tome el asa de siembra y flameé el filamento hasta que este alcance un rojo incandescente. Enfríelo en la proximidad de la llama 10 segundos.
3. Tome con la otra mano el recipiente que contiene la muestra o los microorganismos. Si la muestra esta en un tubo, quite el tapón con los dedos meñique y anular. Y flamee la boca del tubo. Si la muestra esta en una placa de petri, coloque la placa invertida sobre la mesa de trabajo y levante la parte de la placa que contiene el medio de cultivo con los microorganismos. Llévela a la proximidad de la llama del mechero.

4. Trabajando en todo momento en la proximidad de la llama, introduzca el asa de siembra y tome una pequeña muestra del cultivo. Si el medio es líquido, agite ligeramente el tubo y tome una muestra que quedará adherida, por tensión superficial, en el extremo del filamento del asa de siembra.
5. Transfiera el inóculo a otro medio de cultivo estéril, tomando las mismas precauciones en su manejo (trabajando en la proximidad de la llama).
 - a. Si la transferencia se va a realizar en un caldo estéril, descargue el inóculo mediante agitación del asa de siembra en aquél.
 - b. Si la transferencia se va a realizar sobre un medio estéril en una placa de petri, deposite el inóculo en un área pequeña de la superficie de la placa, próxima al borde. Extienda el inóculo formando estrías muy juntas sobre la superficie de una porción pequeña de la placa.

Anexo E

Conservación y mantenimiento

MANTENIMIENTOS DURANTE PERIODOS CORTOS

En este caso es habitual emplear la refrigeración simple, pues a 4 – 8 °C muchos (NO TODOS) cultivos puros de bacterias, levaduras y hongos crecidos sobre medios que contienen agar permanecen viables durante varias semanas [41].

Nota: se debe tener en cuenta que algunos microorganismos son capaces de crecer a las temperaturas comunes de refrigeración (microorganismos psicrófilos).

MANTENIMIENTO A LARGO PLAZO

Para microorganismos utilizados en la producción de alimentos, se recomienda los siguientes proceso de conservación.

Secado: Se realiza añadiendo la suspensión del microorganismo a suero estéril, sobre una tira de papel o silica gel como desecante; esta mezcla es secada a temperatura ambiente, pero con el inconveniente de que no se puede evaluar con exactitud la preservación del microorganismo.

Congelación o crió-conservación: se recurre a congeladores especiales que alcanzan temperaturas inferiores a -70 °C o incluso mejor a nitrógeno líquido.

Liofilización: Consiste en la congelación del microorganismo y luego una extracción de agua al vacío sublimando el hielo formado. Este método es muy confiable en la preservación de los microorganismos.

Anexo F

Pruebas microbiológicas

RECuento DE CÉLULAS POR CÁMARA DE NEUBAUER

La cuantificación de concentración de células permite determinar el número de unidades infectivas por unidad de peso o volumen existentes en una formulación y sirve de base para establecer la dosificación de un producto:

El siguiente es el procedimiento:

se prepara la cepa adicionando agua hasta un volumen conocido 500 o 100 mL de esta forma queda preparada la suspensión madre de la cual se toman 4 submuestras de 1 mL y se depositan en tubos con 9 mL de ADE, quedando de esta manera preparada la dilución 10^{-1} ; se repite el procedimiento llevando 1 mL de esta dilución (10^{-1}) a tubos con 9 mL de ADE, es decir, 10^{-2} y así sucesivamente hasta obtener una dilución 10^{-4} o la dilución apropiada que permite el conteo para estimar el número de células por mililitro de la suspensión [39].

PROCEDIMIENTO [22]:

Para el recuento de células se utiliza la cámara de Neubauer o hemocitometro. la cámara esta dividida en 2 retículos, cada una de estas áreas cuando se observan al microscopio se subdividen en 9 cuadrados de 1 mm^2 cada uno o sea que cada retículo tiene una superficie total de 9 mm^2 . el cuadrado central, esta de nuevo subdividido en 25 cuadrantes y estos en 16 cuadrantes más pequeños.

- Lavar y secar la cámara previamente
- Tomar de la solución inicial o hacer la dilución mas adecuada.

- El tubo de la dilución de la muestra de la cual se va a hacer el conteo de células se agita en un vortex durante 30 segundos e inmediatamente se toma la muestra de 10 μ l (0,01 mL) con una micro pipeta o con un capilar.
- Depositar con cuidado, de tal manera que el líquido entre por capilaridad sin la formación de burbuja en la cámara.
- Si esto ocurre, se retira el cubreobjeto, se lava, se seca la cámara y se repite el proceso.
- En cada compartimiento de la cámara se depositan 10 μ l de la dilución 10^{-4} o de aquella que facilite un conteo de 10 a 50 células por cuadrante.
- Dejar reposar 3 minutos.
- Enfocar la cámara empleando un aumento de 10X, buscar el cuadrante central, se enfoca en tal forma que se observen nítidamente las células y luego se pasa al objetivo de 40X para la realización del conteo.
- Leer en ambos compartimientos de la cámara; contar el cuadrante que tenga 300 células máximo.
- Se realiza contando el total de células presente en los 25 cuadrante centrales o de rojos, o leer los 4 cuadrantes de blancos y el de rojos, sumar y dividir entre 5, o en los 4 cuadrantes de blancos y dividir entre 4 (N).
- Multiplicar por el inverso de la dilución empleada para el conteo.

Para el calculo de numero de células por gramo se debe determinar previamente el peso del sustrato utilizado para el cultivo de la cepa..

CÁLCULOS

El volumen (V) en mm^3 de uno de los cuadrantes de 1 mm^2 es el siguiente:

$V = \text{ancho} \times \text{largo} \times \text{profundidad}$

$V = 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm}$ (profundidad) = $0,1 \text{ mm}^3$ (volumen del cuadrante en el cual se realiza el conteo de células).

Si N es el número promedio de células por cuadrante, entonces E el número de células por mL:

$$\frac{\text{Células}}{\text{ml}}(E) = (N * \text{Dilucion de la suspension}) * \text{Factor de camara}$$

El recuento de células se informa en mL, por lo tanto se debe realizar la conversión de mm^3 a mL, entonces:

$$\begin{array}{l} 1 \text{ mL} \text{-----} 10^3 \text{ mm}^3 \\ X \text{-----} 0,1 \text{ mm}^3 \end{array}$$

$$X = \frac{(1\text{ml} * 0.1\text{mm}^3)}{10^3 \text{ mm}^3} = 0.1\text{ml} * 10^3 = 0.1 * 10^3$$

$$X = 10^1 \times 10^3 = 10^4 \text{ (factor de la cámara)}$$

$$\text{Células / mL} = N \times \text{dilución} \times 10^4$$

Anexo G

Biorreactor Applikon

Este biorreactor es un micro fermentador esterilizable, enchaquetado y con agitación. El recipiente está construido en vidrio, y la tapa con todos sus accesorios en acero inoxidable 316 [1].

Descripción:

La tapa tiene orificios especiales para cada uno de los accesorios, los cuales son:

- Un orificio central para ensamblar el agitador, el cual se acopla directamente al motor, esta operación es libre de contaminación. Este debe ser desensamblado, limpiado y lubricado dos veces al año.
- Un orificio de 6,75 in para el sensor de oxígeno.
- Trece orificios de diferentes dimensiones para otro tipo de sensores: pH, nivel, temperatura, etc., y accesorios como pipetas y mangueras.
- Un orificio roscado especial para conectar el condensador por el cual son eliminados los gases producidos, para así evitar la contaminación del medio y sobrepresionamiento del equipo.
- Otro orificio roscado mas pequeño para ensamblar el tubo toma muestras por el cual se puede extraer la muestra libre de células.

- Seis orificios especiales para los tornillos de ensamble entre la tapa y el recipiente de vidrio.
- Un pozo que tiene contacto directo con el medio al cual se le agrega un liquido con buena transferencia de calor para introducir el termómetro y hacer las lecturas a la temperatura interna.

Especificaciones:

Capacidad:

- Volumen total 3,2 L
- Volumen optimo de trabajo 2,7 L
- Volumen mínimo de trabajo 0,47 mL
- Volumen interno de la chaqueta 1,3 L
- La chaqueta puede ser usada para calentamiento o enfriamiento y gracias a esta el control de la temperatura puede ser más exacto.
- La esterilización debe hacerse en autoclave a 121 °C durante 30 minutos, y este solo puede abrirse cuando la temperatura sea menor de 90 °C, para evitar cambios bruscos de presión que puedan dañar el equipo.
- La limpieza del equipo debe hacerse con etanol al 70% u otro limpiador sustituto, no utilizar material abrasivo.

Procedimiento de esterilización:

Llenar el nivel con el medio de cultivo, este no debe exceder el volumen total 3 L que es especificado, siendo este volumen suficiente para las adiciones

posteriores a la esterilización (inoculación, separación de nutrientes, etc.). Cerrar con la mano seis de las tuercas en forma cruzada.

Verifique que se encuentre en su lugar todos los soportes de los nipples y demás auxiliares. Se debe hacer antes de llevar a cabo esta operación, las conexiones adicionales entre el aire y el líquido y salida de condensados con mangueras de silicona u otro material esterilizable. Debe utilizarse en la salida y entrada de la corriente de aire, filtros apropiados y se debe evitar que durante la esterilización penetre agua a los filtros. Con tal fin se debe usar una abrazadera entre la manguera que comunica la entrada y salida de gases del intercambio y los filtros.

Se debe cerrar todas las conexiones, excepto la salida de aire evitando así el sobrepresionamiento del equipo.

Procedimiento para la toma de muestras:

Se debe adecuar el biorreactor con una línea de toma de muestras, la cual puede ser una manguera esterilizable de diámetro interno pequeño, creándose vacío con una jeringa estéril para succionar la muestra. Es recomendable tomar siempre un volumen constante de muestra para crear homogeneidad en los datos.

Esta operación debe hacerse con guantes, tapa bocas y mecheros encendidos alrededor, para garantizar condiciones asépticas y así evitar contaminaciones en el caldo de cultivo.

Anexo H
Lista de símbolos

Símbolo	Descripción	Unidades
N	número de células	
N ₀	Numero de células iniciales	
κ	constante de velocidad máxima de reacción a concentración infinita de reactante	[h ⁻¹]
K _P	constante de velocidad para formación de producto	[g producto / (g células· h)]
K _s	constante del sustrato	[kg sustrato / m ³].
-K _d	Constante de velocidad	[h ⁻¹]
β	máxima concentración celular alcanzada en tiempos largos	[g producto / (g células· h)]
m _s	Coeficiente de mantenimiento	[g sustrato / (g células· h)]
η	parámetro cinético estipulado para el proceso	
r _P	velocidad de formación de producto	
r _x	velocidad volumétrica de incremento celular en peso seco	[g DCW / L.h]
Rr	Rendimiento real	[Kg ácido / Kg sustrato]
S	concentración del sustrato	[kg sustrato / m ³]
S ₀	Concentración inicial de sustrato	[kg sustrato / m ³]
t	tiempo	[h]
t _{lag}	tiempo de latencia	[h]
t _d	tiempo de duplicación	[h]
t _{exp}	tiempo de la fase exponencial	[h]
μ	velocidad de crecimiento específico	[h ⁻¹]
μ _{max}	Velocidad específica máxima de crecimiento de las células	[h ⁻¹]
v	velocidad del crecimiento específico del número de células	[h ⁻¹]

P	Concentración de producto	[kg _{producto} / m ³]
X = DCW	Concentración de biomasa	[kg _{biomasa} / m ³]
X ₀	concentraciones iniciales de biomasa	[kg _{biomasa} / m ³]
Y _{P/S}	Rendimiento de sustrato en producto	[kg _{producto} / Kg _{sustrato}]
Y _{P/X}	es el rendimiento de biomasa en producto	[kg _{producto} / Kg _{células}]
Y _{X/S}	rendimiento de biomasa por sustrato	[kg _{biomasa} / Kg _{sustrato}]

Abreviaturas:

t _{1/2} :	Vida media
μL:	Microlitro
μm:	Micrómetro
UI:	Unidades internacionales
UV:	Ultra violeta visible
mL:	Mililitro
Nm:	Nanómetro
DNS:	Ácido Dinitro Salicílico
Batch:	Reactor por lotes.
°C:	Grado Centígrado
MRS:	Man Rogosa Sharpe